SÉRIE A, N° 4511
N° D'ORDRE : 5358

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES-PHYSIQUES

PAR

ETEMADI Abol-Hassan

PREMIÈRE THÈSE

Sur la structure et la biogénèse des acides mycoliques des corynebactéries, Nocardia et Mycobactéries

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Sur la biogénèse de l'eicosanol-2 et octadecanol-2 isolés des Mycobactéries

(Thèse originale)

Soutenues le 12 juin 1965 devant la Commission d'examen

MM. E. LEDERER — Président

A. HOREAU
M. VILKAS
} Examinateurs

SÉRIE A, N° 4511
N° D'ORDRE : 5358

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES-PHYSIQUES

PAR

ETEMADI Abol-Hassan

PREMIÈRE THÈSE

Sur la structure et la biogénèse des acides mycoliques des corynebactéries, Nocardia et Mycobactéries

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Sur la biogénèse de l'eicosanol-2 et octadecanol-2 isolés des Mycobactéries

(Thèse originale)

Soutenues le 12 juin 1965 devant la Commission d'examen

MM. E. LEDERER Président

A. HOREAU
M. VILKAS
} Examinateurs

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ... M. ZAMANSKY

MM.	BRELOT	T Analyse supérieure
	PRENANT	T Anatomie et histologie comparée
	GRASSE	T Evolution des êtres organisés
	PREVOST	T Chimie Organique
	WYART	T Minéralo & Cristallo
	TEISSIER	T Zoologie
	MANGENOT	T Biologie végé (Orsay)
	AUGER	T Physique quantique et relativité
	MONNIER	T Physiologie générale
	PIVETEAU	T Paléontologie
	ROCARD	T Physique ENS
	CARTAN	T Mathématiques ENS
	LAFFITTE N.	T Chimie générale
	COULOMB	T Physique du globe
Mlle	COUSIN	T Biologie animale SPCN
	CHRETIEN	T Chimie minérale
	BOCQUET	T Zoologie
	KASTLER	T Physique ENS
	EPHRUSSI	T Génétique
	RIVIERE	T Géologie SPCN & Sédiment (Orsay)
	GAUTHERET	T Biologie végétale PCB
	LUCAS R.	T Recherches Physiques
	TOMAS A.	T Biologie cellulaire
	ARNULF	T Optique appliquée
	MORAND	T Physique enseignement
	SOLEILLET	T Physique PCB
	FORTIER	T Mécanique exp. des fluides
	DRACH	T Zoologie
	QUENEY	T Météo & Dynamique atmos.
	GALLIEN	T Embryologie
	KICHORN	T Botanique
	DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN
Mlle	CAUCHOIS	T Chimie physique
	THELLIER	T Physique du globe
	L'HERITIER	T Biologie générale Orsay
	GRIVET	T Radioélectricité Orsay
	PONCIN	T Mécanique générale
	DU BREIL	T Arith & Théorie des nombres
	QUELET	T Chimie organique
	GAGNIARD	T Géophysique appliquée
	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire
	CUVILLIER	T Micropaléontologie
	JUNG	T Géologie
	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électro.
	WIEMANN	T Chimie organ. & struc
	JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
	VASSY	T Physique de l'atmosphère
	DESTOUCHES	T Théorie physique
	AMIEL	T Chimie générale
	HOCART	T Minéralo. & Cristallo
	MATHIEU J. P.	T Physique optique
	COUTEAUX	T Cytologie
	MAY	T Zoologie
	CHOQUET	T Théorie des fonctions et topologie
	FELDMANN	T Biologie végétale marine
	GUINIER	T Physique des solides (Orsay)
	JOST	T Physiologie comparée
	FORTET	T Calcul des probabilités et Phys. Mathém.
	SCHWARTZ	T Calcul diff. & Intégral
	CHOUARD	T Physiologie végétale
	MALAVARD	T Aviation (Tech. Aéron.)
	NORMANT	T Synthèse organique
	BENARD	T Chimie minérale
	BUVAT	T Botanique ENS
	DUGUE	T Statistique mathématiques
	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
	ULRICH	T Physiologie Vég. Appl.
	MARECHAL	T Optique théor. & appl.
	KIRRMANN	T Théories chimiques
	CHADEFAUD	T Botanique
Mlle	LE BRETON	T Physiol. de la nutrition
	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie
	DEVILLERS	T Anatomie & Histo compar.
	EHRESMANN	T Topologie algébrique
	FRANCON	T Physique SPCN
	GLANGEAUD	T Géographie phys. & géol.
	GODEMENT	T Mathématiques MGP
	PISOT	T Technique math. de la phys.
	ROCH	T Géologie
	SCHATZMANN	T Astrophysique
	TERMIER	T Géologie générale
	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
	LENNUIER	T Physique MGP
	RIZET	T Génétique Orsay
	ROUTHIER	T Géologie appliquée
Mme	TONNELAT	T Physique théorique
	DIXMIER	T Mathématiques MPC
	SOUCHAY	T Chimie générale
	AIGRAIN	T Electrotechnique générale
	BRUSSET	T Chimie systématique
	LEVY M.	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme	CHAIX	T Chimie biologique
Mme	HUREL PY	T Biologie végétale PCB
	PANNETIER	T Chimie générale
	BRUN	T Mécanique des fluides I
	LEDERER	T Chimie biologique (Orsay)
Mme	DUBREIL	T Mathématiques (Agrég.)
Mme	LELONG	T Mathématiques II ENS
	BELLAIR	T Géologie SPCN
	COTTE	T Physique électricité
	DUBOIS J. E.	T Chimie organique
	LAMOTTE	T Zoologie ENS
	MICHEL A.	T Chimie minérale Orsay
	OLMER	T Energétique générale
	ROUAULT	T Electricité (Orsay)
	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
	BARCHEWITZ	T Chimie physique
	BROSSEL	T Physique atomique
	BUSER	T Physiologie comparée
	CAMUS	T Physiologie végétale
	CASTAING	T Physique II Thermo (Orsay)
	CURIEN	T Minéralo & cristal.
	MOYSE	T Physiologie végétale (Orsay)
Mme	CHARNIAUX-COTTON	T Evolution des êtres organisés
	POSSOMPES	T Zoologie
	PULLMANN	T Chimie quantique
	TEILLAC	T Physique Nucl. & radioactivité (Orsay)
	TONNELAT	T Biol. Physico-chim. (Orsay)
	VILLE	T Econométrie
	WILLEMART	T Chimie PCB
	DODE	T Chimie (Orsay)
	FREYMANN	T Recherches physiques
	GUINOCHET	T Biologie végétale SPCN (Orsay)
	ROLLET	T Chimie minérale
Mlle	JOSIEN	T Chimie SPCN
	CHEVALLEY	T Géométrie algéb. et théorie des groupes
	ARNOULT	T Electronique Orsay
	CHAPELLE	T Physique I (Orsay)
	DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)
	DENY	T Mathématiques générales (Orsay)
	GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides
	LUCAS	T Géologie
	ALLARD	T Chimie physique
	BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales (Orsay)
	BRICARD	T Météor. et physique de l'atmosphère
Mme	ALBE FESSARD	T Psycho. physio.
	FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay)
	JULIA M.	T Etudes des moléculaires complexes
	LENDER	T Biologie animale SPCN (Orsay)
	MAGAT	T Physico chimie des radioéléments
Mlle	QUINTIN	T Electrochimie
	MONOD	T Chimie du métabolisme
	BENOIT	T Physio. animale (Orsay)
	DE POSSEL	T Analyse numérique
	CHARLOT	T Chimie analytique
	LEMEE	T Ecologie végétale (Orsay)
	GUERIN	T Chimie MPC (Orsay)
	CHATELET	T Chimie PCB
	JEAN	T Physio. nucléaire (Orsay)
	MATTLER	T Physique SPCN
	BENGERARD	T Zoologie (Orsay)
	BERTEIN	T Electronique (Orsay)
	BOUISSIERES	T Radiochimie
Mme	COUTURE	T Thermo. et méca. physique
	ELLENBERGER	T Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
	FRANC	T Biologie animale PCB
	SCHNELL	Botanique tropicale
	STLKOWSKI	T Physiologie végétale
	ACHER	T Chimie biologique
	BAUDOIN	T Biologie animale PCB
	BEAUMONT	Biologie animale SPCN
	BLAMONT	Géophysique ionosphère
	BOUREAU	T Botanique
	CURIE D.	Physique MGP
	DURAND DELGA	T Géologie
	FREON	T Chimie organique (Orsay)
	HELLER	T Physiologie végétale
	TORTRAT	T Calcul des probabilités
	CAILLEUX	T Géologie SPCN
	MAGNAN	Physique électricité
	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appli. à la Chimie Théor. & à la Phys. Nucléaire
Mlle	FOURCROY	Biologie végétale SPCN
Mme	CHOQUET BRUHAT	Mécanique analytique et méca. céleste
Mlle	VEIL	T Physiologie générale
	LWOFF	T Microbiologie
	SIESTKUNCK	T Méca. phys. & expérimentale
	LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
	BROCHARD	T Physique PCB (Orsay)
	CABANNES	T Mécanique générale
	LESIEUR	T Math. I (Orsay)
	MAZET	T Méca. générale (Orsay)
	CAIRE	Géographie physique et géo. dynamique
	COMOLET	Méca. des fluides
	CORABOEUF	T Physiologie animale (Orsay)
	DELLOUE	Physique de l'atmosphère
	GORENFLOT	Botanique II (Orsay)
	HOUILLON	Biologie animale PCB
	JULLIEN J.	Chimie SPCN (Orsay)
	MALGRANGE	T Technique Math. de la physique (Orsay)
	OLIVIER	Antropologie
	NOZERAN	T Botanique II (Orsay)
	BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay)
	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay)
	KAHANE	T Mathématiques (Orsay)
	SAMUEL	T Mathématiques ENS féminines
	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay)
	THIRY	T Méca. céleste
	ABELES	Physique SPCN
	AMAT	T Physique PCB
	AUBOIN	T Géologie
Mme	BENOIT-GUEUTAL	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
	BOUGIS	Biologie marine Villefranche/mer
	BRUHAT	T Math. MPC
	BRUNN	T Géologie historique (Orsay)
	CHABBAL	T Physique MGP (Orsay)
	DEHEUVELS	T Math. propé.
	D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)
	FURON	T Géologie SPCN
Mme	GANS	T Génétique
	GENEVES	Biologie végétale PCB
	GUILBERT	Physique CUS Orléans
	HUPE	T Pétrographie
	HOLLANDE	T Biologie générale
	LIONS	T Analyse numérique
	MAITTE	T Chimie PCB
	MEYER	Physique propédeutique
	PANIGEL	Biologie générale
	RAVIER	Pétrographie
	ROSEAU	T Méca. théorique des fluides
	ROUBINE	Electronique
	SILBER	T Chimie PCB
	UEBERSFELD	T Electronique
	YVON	T Théories physiques
	HERVE	T Mathématiques
	NERON	T Math. MPC (Orsay)
Mme	PECKER WIMEL	T Astrophysique
	BALKANSKY	Physique MPC
	LE CORRE	T Electricité
	DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)
	GOURDIN	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
	LEHMANN	T Phys. Exp. des hautes énergies
	NATAF	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
	ECHALIER	Biologie animale PCB
	BARRAUD	Physiologie cellulaire
	LIORET	Physiologie végétale (Orsay)
	DARS	Géologie structurale et Géologie appliquée
	CAMEFORT	T Botanique (agrégation)
	VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
	BLAQUIERE	Electronique (Orsay)
	ARNOUS	T Physique théorique
	TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans)
	MALLIAVIN	T Mathématiques propé. (Orsay)
	GAUDEMAR	Chimie propé
	PEREZ Y JORBA	Physique Exp des hautes énergies (Orsay)
	DAVID	T Chimie (agrégation Orsay)
	BROUSSE	T Mécanique théorique
	ROSCH	T Astronomie
	GUY	T Physique expérimentale
	LAZARD	Math MPC
	MOREL P.	Physique MPC
	ARSAC	Programmation
	LEFEBVRE	Chimie MPC
	CHAPEVILLE	Biochimie
	BENOIT	Physique CPEM
	RIO	Chimie CPEM
	JAUZEIN	Géologie ENS
	PREVOST G.	BV CPEM
	FAVARD P.	BA CPEM
	VILKAS	Chimie CPEM
Mlle	FICINI	Chimie CPEM
	LEQUEUX	Astronomie
	COHEN TANNOUDJI	Physique MPC
	TAVERNIER	Physique CPEM
Mme	ROIZEN	Physique CPEM
	DURAND M.	BA SPCN
	PASCAUD	Physiologie
Mme	PETIT	BA CPEN
	BROUSSE	Géologie (Orsay)
	CAGNIAC	Physique agrégation (Orsay)
	LEBERRE	Zoologie (Orsay)
	SCHEFFER	Microbiologie (Orsay)
	de GENNES	Physique des solides (Orsay)
	RIOU	Physique nucléaires exp. (Orsay)
	CLAUSER	Chimie biologique (Orsay)
	CHEVALIER	Physiologie animale (Orsay)
	JANCOVICI	Physique atomique (Orsay)
	FALK-VAIRANT	Physique nucléaire (Orsay)
	FETIZON	Chimie propé. (Orsay)
	CERF	Mathématiques (Orsay)

Secrétaire général ... R. POULAIN

A MA FEMME

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0070

Cette thèse a été préparée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, dirigé par Monsieur le Professeur E. Lederer.

Je suis heureux de pouvoir exprimer ici à Monsieur le Professeur Lederer ma sincère reconnaissance pour l'encouragement qu'il n'a cessé de me témoigner tout au long de ce travail dont il a bien voulu assurer la direction et au cours duquel j'ai pu bénéficier constamment de son enseignement et de ses conseils éclairés. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur A. Horeau ma plus vive reconnaissance pour sa sollicitude constante à mon égard.

Je remercie Monsieur le Professeur A. Horeau et Monsieur le Professeur M. Vilkas d'avoir bien voulu faire partie de mon jury.

Plusieurs collaborateurs m'ont aidé aux différents stades de ce travail ; il m'est agréable de les citer ; Madame R. Okuda, Mademoiselle J. Gasche, Madame A.M. Miquel, Mademoiselle O. Torquebiau, Monsieur N.P.W. Acharia ; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Les spectres de masse ont été effectués au début par le Dr. W. Vetter et puis par le Dr. J.A. Mc Closkey et le Dr. B. Das ; je les en remercie vivement ainsi que Monsieur P. Varenne pour la qualité exceptionnelle des spectres effectués par lui. Je remercie également Madame Orley qui a mesuré certains spectres.

Je remercie le Dr. M. Barber (A.E.I. Manchester) qui a effectué les spectres de masse des acides mycoliques des Mycobactéries sur un appareil à haute résolution et à double focalisation (MS9) et qui a procédé à certaines mesures de masse. Ces mesures ont grandement facilité l'étude de structure de ces acides.

Les spectres de R.M.N. ont été effectués à l'I.C.S.N. par Madame L. Alais ; je la remercie ainsi que Monsieur A. Gaudemer pour plusieurs discussions utiles de ces spectres.

Les spectres I.R. ont été mesurés par Mademoiselle Y. Lemaitre ; je la remercie pour sa diligence dans les mesures et la qualité de ses spectres.

Je remercie Monsieur L. Jover qui a dessiné les figures de cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier tous mes camarades de laboratoire, et notamment Monsieur D. Mercier dont l'esprit de collaboration a aidé à l'avancement de ce travail.

Je remercie également Mademoiselle E. Zissmann qui a effectué certaines cultures de bactéries.

INTRODUCTION

Les acides mycoliques sont des acides β-hydroxylés portant en α une longue chaîne alyphatique (1). Cette définition englobe les acides mycoliques des Mycobactéries qui ont environ 80 atomes de carbone, les acides nocardiques de différentes espèces de Nocardia avec environ 50 atomes de carbone et les acides corynomycoliques des Corynébactéries possédant environ 32 atomes de carbone (2).

Le premier représentant de ce type d'acides a été isolé en 1929 par Anderson (3) sous forme d'une poudre blanche, encore impure, appelée "cire insaponifiable" qui devait contenir en majeure partie les acides mycoliques. Par saponification prolongée de cette "cire" Stodola, Lesuk et Anderson (4) ont isolé un acide hydroxylé, acide mycolique, et lui ont attribué la formule $C_{88}H_{176}O_4$. Une réaction caractéristique des acides mycoliques a été découverte par ces auteurs qui ont montré que leur pyrolyse donnait de l'acide hexacosanoïque. Cette réaction a été expliquée par Asselineau et Lederer (1) qui ont attribué la pyrolyse à la nature α-ramifiée, β-hydroxylée de ces acides et ont écrit la réaction suivante :

$$R_2 - \underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}} - \underset{\displaystyle R_1}{\underset{|}{CH}} - COOH \longrightarrow R_2CHO + R_1 - CH_2 - COOH$$

De nombreux travaux ont été entrepris, essentiellement par deux équipes de chercheurs : celle de J. Asselineau et E. Lederer et celle de N. Polgar, en vue d'élucider la structure de ces acides.

Les travaux de J. Asselineau dans le laboratoire de E. Lederer ont porté essentiellement sur la structure des acides mycoliques de différentes souches de *M. tuberculosis*. S'inspirant de ses travaux, M. Barbier, J. Pudles, H. Demarteau-Ginsburg et G. Michel ont étudié la structure des acides mycoliques de différentes souches de *Mycobacterium tuberculosis*, de *M. avium*, des espèces saprophytes de Mycobactéries, des Corynébactéries et des Nocardia.

Dans tous les cas la pyrolyse des acides mycoliques a fourni un ou plusieurs acides gras : l'acide corynomycolique de *C. diphtheriae* (5, 6) donne par pyrolyse de l'acide palmitique ; les acides nocardiques de *Nocardia asteroides* donnent de l'acide palmitique et myristique (7) ; les acides mycoliques des Mycobactéries donnent de l'acide tétracosanoïque ou hexacosanoïque. A la suite de la mise en évidence de la nature α-ramifiée, β-hydroxylée des acides mycoliques, la synthèse de l'acide corynomycolique et de ses homologues a été effectuée, in vitro, par condensation de deux unités d'acides gras (sous forme d'ester méthylique) (8, 9) :

$$2R - CH_2 - COOCH_3 \xrightarrow{NaH} R - CH_2 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - \underset{R}{CH} - COOCH_3$$

$$\xrightarrow{H_2} R - CH_2 - CH(OH) - \underset{R}{CH} - COOCH_3$$

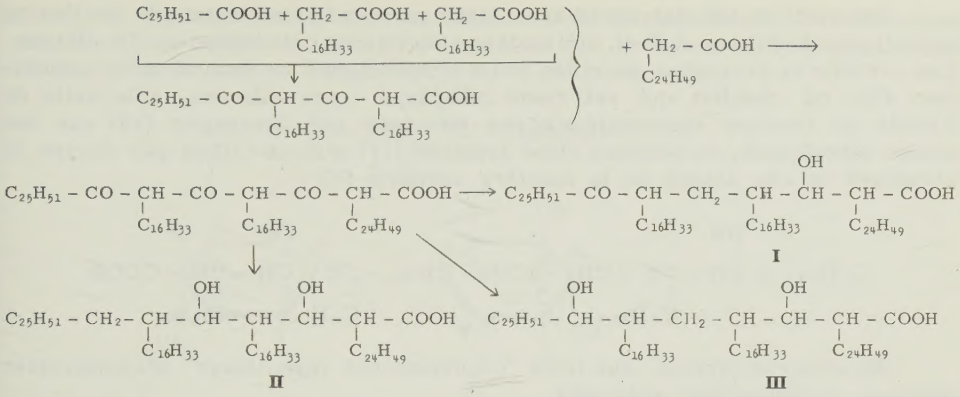
Une hypothèse de biogénèse a résulté de la constance de la structure partielle des acides mycoliques et de la possibilité de la synthèse in vitro des acides α-ramifiés, β-hydroxylés à partir de deux molécules d'acide gras : Asselineau et Lederer se sont demandé si un acide gras ne pouvait pas s'incorporer tel quel dans la structure d'un acide mycolique (10, voir aussi 2, 6 et 11).

L'acide corynomycolique des Corynebactéries se formerait par condensation de deux unités d'acide palmitique. Les acides nocardiques des Nocardia se formeraient par la condensation de trois unités en C_{16} ou de deux unités en C_{16} et une unité en C_{18}. Les acides mycoliques de Mycobactéries se formeraient par la condensation de deux unités en C_{24} (ou C_{26}) et deux unités en C_{18} (voir tableau I).

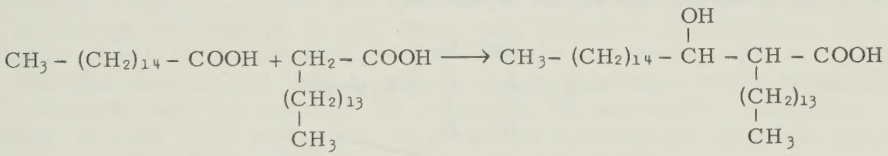
Tableau I (selon Lederer (2))

	Nombre de souches étudiées.	Atomes de carbone des acides mycoliques	Acide à plus longue chaine normale des bactéries.	Biosynthèse
Corynebactéries	2	C_{32}	C_{16}	2×16
Nocardia	4	C_{50}	C_{18}	3×16 ? $2 \times 16 + 18$?
Mycobacterium avium, smegmatis et phlei	6	C_{84}	C_{24}	$2 \times 24 + 2 \times 18$
M. tuberculosis, souches bovines et humaines.	12	C_{88}	C_{26}	$2 \times 26 + 2 \times 18$

Par exemple, pour le cas des acides mycoliques des souches humaines et bovines de *M. tuberculosis*, le schéma de biogénèse suivant a été proposé (voir par exémple 11) :

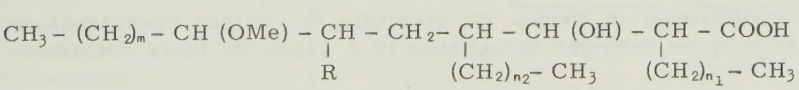


La possibilité de la condensation de deux acides gras à longue chaîne, appelée "condensation mycolique", constitue à nos yeux un fait essentiel dans la biogénèse des acides mycoliques. Or, Gastambide-Odier et Lederer (12) ont vérifié cette possibilité dans le cas de l'acide corynomycolique de *C. diphtheriae*. Ces auteurs ont montré que deux unités d'acide palmitique se condensent pour donner l'acide corynomycolique :



Des études nombreuses ont été entreprises en vue d'élucider la structure des acides mycoliques et de vérifier les structures hypothétiques (I, II et III) et d'autres structures dérivées de celles-ci. Ces études laborieuses n'ont pas apporté de preuves convaincantes en faveur de ces structures ; pourtant, aucun fait chimique ne les a contredites avant que le présent travail soit entrepris ; par contre, l'élégance séduisante de l'hypothèse les a fait généralement admettre, Polgar et Coll. (13, 14) à propos d'un mélange d'acides mycoliques (isolé des souches DT, PN et C) ont admis la structure générale proposée pour les acides mycoliques à quelques détails près :

Ces auteurs proposent la structure suivante (IV) pour l'acide mycolique :

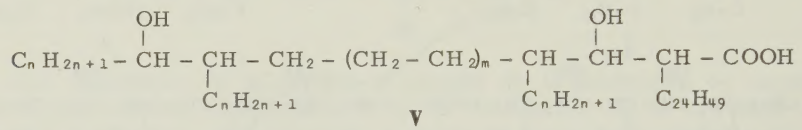


IV

avec $n_1 = 21$ et 23 $n_2 = 21$ et 23 R = un radical alcoyle m = environ 17

Une telle structure est en faveur de trois condensations mycoliques au cours de la biogénèse.

Pourtant un fait demeurait troublant : par oxydation chromique de l'acide mycolique, Anderson et Coll. (15) isolaient de l'acide octadécane-1, 18-dioïque. Les structures proposées pour les acides mycoliques ne pouvaient s'accomoder d'un tel résultat qui est resté inexpliqué ; par ailleurs, à la suite de l'étude de couches monomoléculaires effectuée par Stenhagen (16) sur des acides mycoliques, Asselineau s'est demandé (17) s'il ne fallait pas écrire la structure de ces acides de la manière suivante (V) :

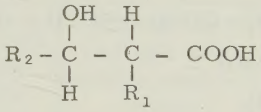


V

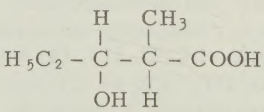
En d'autres termes, aux trois "condensations mycoliques" s'ajouteraient quelques condensations acétiques.

Stéréochimie des acides mycoliques

La complexité de la structure des acides mycoliques a empêché les chercheurs d'effectuer l'étude de la stéréochimie de ces composés ; pour le cas le plus simple, celui de l'acide corynomycolique, Asselineau et Lederer (18) ont proposé la configuration 2-L et 3-D, ce qui, selon les conventions de Cahn, Ingold et Prelog (19) correspond à la configuration 2-S et 3-R ; c'est cette stéréochimie qui est représentée dans la manière d'écrire usuelle de la formule générale des acides mycoliques :



Dans ce qui suit nous nous sommes conformés à cette représentation. Rappelons toutefois que d'après une étude récente (20) l'acide (-)-2-méthyl, -3-hydroxy-pentanoïque, produit d'hydrolyse de la mycobactine P (un facteur de croissance isolé de *M. phlei*) aurait la configuration 2-R et 3-S, il devrait donc s'écrire de la manière suivante :



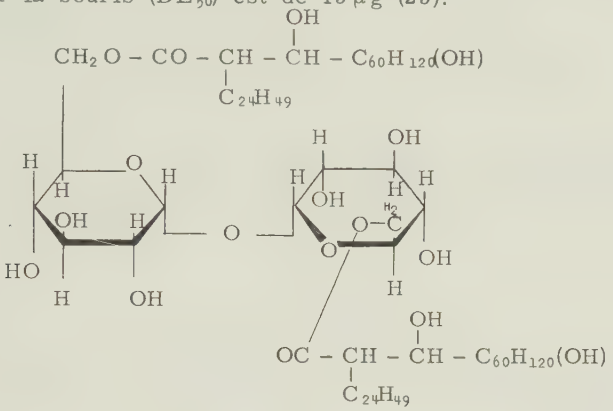
Propriétés biologiques des acides mycoliques et de leurs dérivés :

Parallèlement à l'étude de structure des acides mycoliques, on s'est intéressé à leurs activités biologiques et à celles de leurs dérivés :

Réactions tissulaires : Les acides mycoliques (21) ainsi que les cires D(*) (22) injectés à des animaux provoquent la formation d'un granulome, avec des cellules ressemblant à des éléments épithélioïdes et des cellules géantes que l'on trouve dans les follicules tuberculeux.

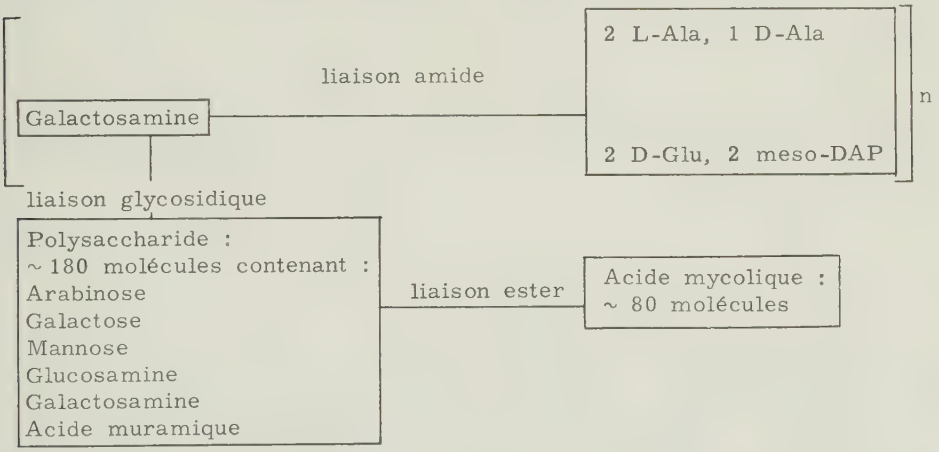
(*) Pour la définition des cires D voir chapitre I ; voir la page suivante pour la structure.

Toxicité : Le cord factor, facteur toxique isolé de Mycobactéries, découvert par H. Bloch (23) est le 6,6'-dimycolate de tréhalose (VI) (24). La dose léthale pour la souris (DL_{50}) est de 15 µg (25).



VI

Effet adjuvant : La fraction de cires D de Mycobactéries qui est formée de peptido-glyco-lipides, (contenant l'acide meso-α, ε-diamino-pimélique, l'alanine et l'acide glutamique) présente l'effet adjuvant comme l'ont montré White, Bernstock, Johns et Lederer (26). Cet effet se manifeste par une augmentation de production d'anticorps si ces cires sont injectées conjointement avec un antigène. Ainsi, l'effet adjuvant mis en évidence par Freund (27) en utilisant les bacilles tuberculeux tués et mis en suspension dans l'huile de paraffine est retrouvé dans un mélange de composés de structures complexes. Le schéma suivant (VII) représente la structure hypothétique proposée pour la fraction de cires D douée de propriété adjuvante (28)(*).



VII

La fraction hydrosoluble provenant de l'hydrolyse de ces cires, ainsi que les acides mycoliques seuls ne présentent pas cette propriété (29).

(*) Ce schéma vient d'être légèrement modifié (voir Ref. 28 bis).

Hypersensibilité retardée : Les cires D, comme l'a montré Raffel (30), jouent également un rôle dans l'établissement de l'hypersensibilité tuberculinique ; ici encore ni l'hydrosoluble provenant de la saponification, ni les acides mycoliques seuls ne sont actifs. On a pensé que d'autres esters d'acides mycoliques (Cord Factor, mycolates de méthyle etc.) présentaient également cette propriété (31, 32) mais ces résultats n'ont pas été confirmés (29, 33).

Les propriétés des acides mycoliques et surtout de leurs dérivés, d'une part, et l'insuffisance de nos informations sur la nature exacte de ces acides, d'autre part, nous ont incités à nous attacher à la détermination de leur structure et à l'élucidation de leur biogénèse.

Notre travail comprend 9 chapitres :

Le chapitre I concerne les techniques d'isolement et d'étude de structure des acides mycoliques. En raison de l'importance particulière de deux techniques microanalytiques d'étude de structure des acides mycoliques, la chromatographie pyrolytique et la spectrométrie de masse, nous avons consacré le chapitre II à ce sujet.

Dans les chapitres III, IV et V nous étudions respectivement la structure des acides α-mycoliques d'une espèce saprophyte *(Mycobacterium smegmatis)*, d'une espèce atypique *(M. kansasii)* et d'une espèce humaine virulente *(M. tuberculosis* Test) de Mycobactéries.

Le chapitre VI est consacré à l'étude de la biogénèse des acides α-smegmamycoliques.

Le chapitre VII traite de la structure et de la biogénèse des acides nocardiques de *Nocardia asteroides.*

Le chapitre VIII concerne, dans un premier paragraphe, la structure des acides α-ramifiés, β-hydroxylés isolés de quelques Corynébactéries aérobies, et dans un deuxième paragraphe l'isolement des acides isopentadécanoïque et isoheptadécanoïque de *C. parvum* (une espèce anaérobie).

Dans le chapitre IX nous donnons un résumé du travail en essayant de dégager, à la lumière de l'étude structurale et biogénétique des acides mycoliques, la valeur taxonomique de ces acides, et leur signification phylogénétique.

BIBLIOGRAPHIE

(1) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Nature, 166, 782 (1950).

(2) E. LEDERER - VIIème Corso Estivo di Chimica, Milano 1962, Accademia Nazionale del Lincei, Roma, 159-179, (1964).

(3) R.J. ANDERSON - J. Biol. Chem., 85, 351 (1929).

(4) F.H. STODOLA, A. LESUK et R.J. ANDERSON - J. Biol. Chem., 126, 505 (1938).

(5) E. LEDERER et J. PUDLES - Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 759 (1954).

(6) E. LEDERER, J. PUDLES, S. BARBEZAT et J.J. TRILLAT - Bull. Soc. Chim. (France) 19, 93 (1952).

(7) G. MICHEL, C. BORDET et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci., 250, 3518 (1960).

(8) E. LEDERER, V. PORTELANCE et K. SERCK-HANSSEN - Bull. Soc. Chim. (France), 413 (1952).

(9) J. POLONSKY et E. LEDERER - Bull. Soc.Chim. (France) 504 (1954).

(10) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Chimie des lipides bactériens, dans : Progrès dans la chimie des substances organiques naturelles, 10, (1953) P 170-271, Springer, Vienne.

(11) J. ASSELINEAU et E. LEDERER, Dans K. BLOCH - Lipide Metabolism, Wiley, London 1960, P. 336-406.

(12) M. GASTAMBIDE-ODIER et E. LEDERER - Biochem. Z. 333, 285 (1960).

(13) E.D. MORGAN et N. POLGAR - J. Chem. Soc. 3779 (1957).

(14) C. MALANI et N. POLGAR - J. Chem. Soc. 3092 (1963).

(15) A. LESUK et R.J. ANDERSON - J. Biol. Chem. 136, 603 (1940).

(16) E. STENHAGEN - cité dans la référence 17 (page 155).

(17) J. ASSELINEAU - Les lipides bactériens, Hermann, Paris (1962).

(18) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - A Ciba Foundation Symposium on experimental tuberculosis, London 1955, P. 14.

(19) R.S. CAHN, C.K. INGOLD et V. PRELOG - Exprerientia 12, 81 (1956).

(20) G.A. SNOW - Biochem. J. 94, 160 (1965).

(21) B. GERSTL, R. TENNANT et O. PELZMAN - Am. J. Pathol., 21, 1007 (1945).

(22) A. DELAUNAY, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Compt. Rend. Soc. Biol., 145, 650 (1951).

(23) H. BLOCH - J. Exp. Med., 91, 197 (1950).

(24) H. NOLL, H. BLOCH, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 20, 299 (1956).

(25) H. BLOCH et H. NOLL - Brit. J. Exp. Pathol., 36, 8 (1955).

(26) R.G. WHITE, L. BERNSTOCK, R.G.S. JOHNS et E. LEDERER - Immunology, 1, 54 (1958).

(27) J. FREUND, J. CASALS et E.P. HOSMER - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 37, 509 (1937).

(28) P. JOLLES, D. SAMOUR et E. LEDERER - Arch. Biochem. Biophys. Supplement 1, 283-289 (1962).

(28 bis) P. JOLLES, D. SAMOUR-MIGLIORE, H De WIJS et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 83, 361 (1964).

(29) R.G. WHITE - résultat inédit.

(30) S. RAFFEL - Experientia, 6, 410 (1950).

(31) S. RAFFEL, E. LEDERER et J. ASSELINEAU - Feder. Proc. 13, 509 (1954).

(32) S. RAFFEL, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - A Ciba Foundation Colloquium on experimental tuberculosis, London 1955, P. 174.

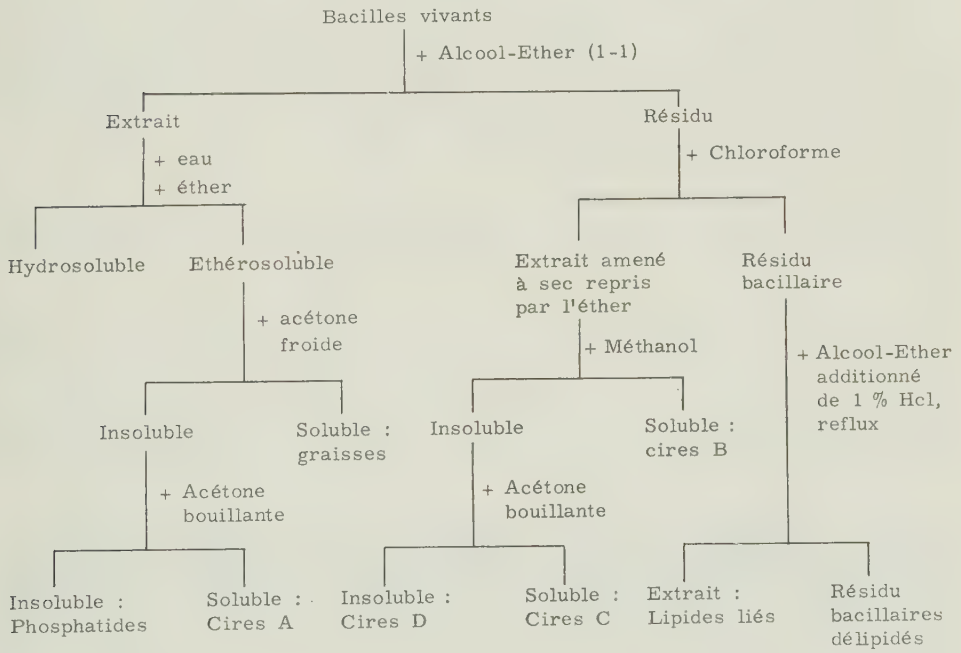
(33) E. LEDERER - Angew. Chem. 241, 76 (1964).

CHAPITRE I

TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET D'ÉTUDE DE STRUCTURE DES ACIDES MYCOLIQUES

A - ISOLEMENT DES ACIDES MYCOLIQUES -

Les lipides des Mycobactéries peuvent être fractionnés par la méthode d'Anderson (1) légèrement modifiée par Asselineau et Lederer (2, 3) selon le schéma suivant :



En résumé, après extraction des bactéries avec le mélange alcool-éther (1-1), on traite le résidu bacillaire au chloroforme. L'extrait chloroformique est ensuite séparé en cires B, cires C et cires D. En précipitant la solution éthérée de l'extrait chloroformique avec le méthanol on isole une fraction soluble qui est appelée cires B. On chauffe alors le résidu au reflux,

à plusieurs reprises, avec l'acétone et on filtre. Le filtrat contient les cires C. Le résidu constitue les cires D.

Les acides mycoliques ont été isolés surtout à partir des cires D (par saponification) et également à partir des cires C des Mycobactéries. Cette technique, utile pour le fractionnement détaillé des lipides bactériens, aboutit évidemment à des fractions formées encore de mélanges de composés. Elle a l'inconvénient d'être longue. Nous l'avons appliquée pour l'obtention des acides mycoliques de *M. smegmatis* et de *M. kansassi*. Les acides mycoliques Test ont été également préparés par la saponification des cires D.

Au cours de l'étude de la biogénèse des acides α-smegmamycoliques et des acides nocardiques de *N. asteroides*, nous avons utilisé une voie d'accès rapide aux acides mycoliques. Les bactéries, après le temps de culture nécessaire, sont filtrées, et encore humides, traitées avec de la KOH méthanolique à 5 %. On isole alors soit la fraction acide soit encore l'étherosoluble entier.

Dans le cas des acides mycoliques de Mycobactéries, il est possible de procéder à un dégrossissement du matériel disponible en traitant le mélange par le méthanol à chaud selon Clermonté et Lederer (4). Les acides inférieurs se solubilisent en grande partie par ce traitement et le résidu insoluble contient surtout les acides mycoliques.

Dans le cas des acides nocardiques et corynomycoliques ce procédé n'est pas applicable. Ces acides sont solubles dans le méthanol à chaud.

Quoi qu'il en soit, le mélange de produits est traité par le diazométhane et chromatographié ensuite sur gel de silice. On peut alors suivre l'élution de différents esters mycoliques par chromatographie sur couche mince. Cette dernière technique a été utilisée pour la première fois, dans le domaine des acides mycoliques, par Lanéelle (5).

La séparation de différents esters mycoliques sur acide silicique est également possible mais il nous a paru que la séparation des esters d'acides gras banaux de ceux d'acides mycoliques s'effectuait mieux sur le gel de silice.

Quand on chromatographie sur acide silicique ou gel de silice les mycolates de méthyle bruts, on observe très souvent des fractions qui s'éluent très facilement des colonnes avant la sortie des mycolates. Une chromatographie fine permet d'observer l'existence de plusieurs fractions de ce genre. Dans ces fractions nous avons pu mettre en évidence l'existence de méromycolates(*) et de méronocardates de méthyle (voir par exemple figure 1, chapitre III).

Le comportement, en chromatographie sur couche mince de ces méromycolates de méthyle, est identique à celui des méromycolates et méronocardates obtenus à partir des acides α-mycoliques et nocardiques : leur Rf en chromatographie sur couche mince est supérieur à celui du tétracosanoate ou palmitate de méthyle utilisé comme témoin (voir figure 1 chapitre IV et figure 1 chapitre VII).

Les différents mycolates de méthyle obtenus par chromatographie sur colonne et dont on vérifie l'homogénéité par chromatographie sur couche

---

(*) Polgar (6) a proposé d'appeler acide méromycolique, l'acide obtenu après élimination par oxydation de l'acide anhydromycolique) des carbones 1 et 2 et la ramification en α d'un acide mycolique.

mince, ne sont pas des composés purs. Nous avons montré que très généralement il s'agissait d'un mélange d'homologues ou de composés variant par le nombre d'insaturation. Une observation s'impose ici ; au fur et à mesure que l'élution se poursuit, des homologues de plus faibles poids moléculaires peuvent être élués, de sorte que, à la limite, l'obtention de deux taches distinctes sur couche mince ne signifie pas toujours une différence de fonction et peut être attribuée à l'existence de deux familles de mycolates de méthyle différant uniquement par un nombre important d'atomes de carbone. Une autre remarque est également à faire : l'ordre d'élution des produits au cours des chromatographies sur colonne (en utilisant successivement l'éther de pétrole, le benzène, l'éther ...) ne va pas toujours de pair avec leur Rf. Au cours de l'examen sur couche mince (examen avec le mélange éther de pétrole-éther), il arrive qu'une fraction plus retenue sur la colonne donne à l'examen sur couche mince des taches qui ont un Rf supérieur à celui des fractions moins retenues.

B - ETUDE DE STRUCTURE DES ACIDES MYCOLIQUES

a) Examen spectrométrique des mycolates de méthyle :

Spectre I.R. : Le spectre I.R. des mycolates de méthyle présente deux régions caractéristiques : *la région d'absorption* des OH où on observe des bandes vers 3535-3540 cm^{-1} et vers 3610-3620 cm^{-1} (un épaulement existe généralement entre ces deux bandes) et *la région d'absorption des carbonyles* où on observe deux bandes, une vers 1725 et une autre vers 1745 cm^{-1}, la première étant attribuable au C = O chelaté. Selon l'acide étudié d'autres régions peuvent renseigner sur la structure : une bande à 1025-1030 cm^{-1} peut indiquer l'existence d'un cycle propanique, ainsi qu'une bande vers 3060 cm^{-1} (voir figure 1).

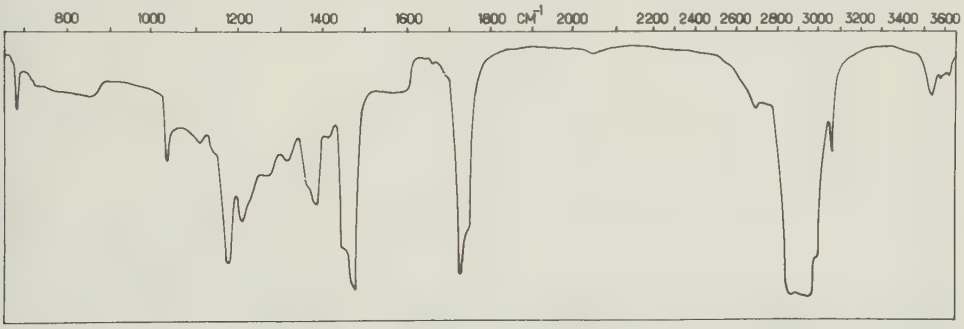


Figure 1 : Spectre I.R. des α-kansamycolates de méthyle.

L'observation d'une bande vers 1100 cm^{-1} indique la possibilité de l'existence d'un groupement O-Alcoyle (étheroxyde) : c'est ainsi que la bande à 1106 cm^{-1} sur le spectre d'α'-mycolates de méthyle Test est attribuable à l'existence d'un groupement méthoxyle (le spectre de R.M.N. confirme cette proposition).

L'étude du spectre I.R. dans le CS_2 peut permettre la mise en évidence d'une double liaison trans ; bande vers 975 cm^{-1} (voir chapitre III).

Spectre de R.M.N. (*) : Il renseigne rapidement sur l'existence de l'insaturation :

(*) Pour les mesures de spectre de R.M.N. rapportés dans ce travail, un appareil Varian A-60 a été constamment utilisé, et le tétraméthylsilane a servi de référence interne.

signaux vers 320 cps (figure 2), de cycle propanique : signaux centrés à 35 cps et à -18 cps environ (figure 3).

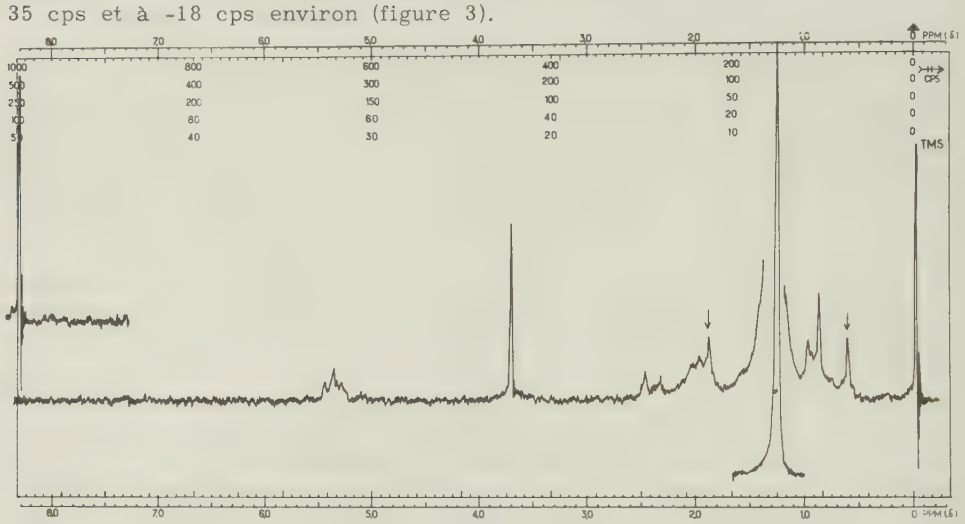


Figure 2 : Spectre de R.M.N. des α-smegmamycolates de méthyle. Les flèches à droite du spectre indiquent les bandes latérales de rotation. Il en est de même pour les autres spectres de R.M.N. rapportés dans ce chapitre.

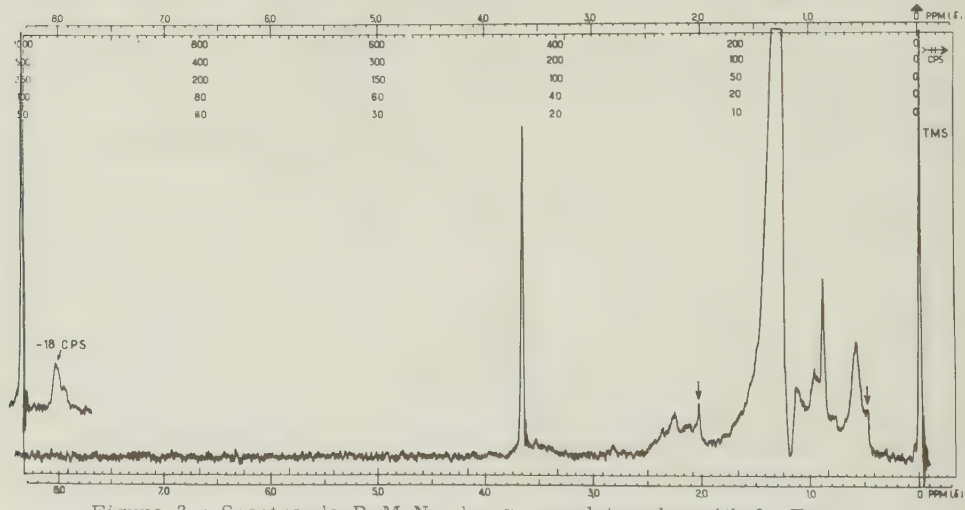


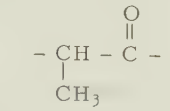
Figure 3 : Spectre de R.M.N. des α-mycolates de méthyle Test.

L'étude de la région d'absorption des groupements méthyle est également intéressante : Il nous a paru difficile d'obtenir des renseignements précis sur le nombre de groupements méthyle dans un acide mycolique, mais on peut tout de même tirer des renseignements qualitatifs appréciables de l'étude des spectres de R.M.N. : Si on compare les signaux centrés à 52 cps sur le spectre d'α-smegmamycolates de méthyle (figure 2) et ceux centrés sur 54 cps sur le spectre d'α-mycolates Test (figure 3), on peut constater une différence significative qui est mieux visible encore sur les spectres de méromycolates correspondants. Le pic accentué à 58 cps sur le spectre d'α-smegmamycolates de méthyle est l'un des signaux du doublet des protons du groupement méthyle secondaire ($CH = CH - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_n \ldots$) dont la présence

est démontrée par l'étude des produits de dégradation (voir chapitre III).

Dans le cas des β-smegmamycolates de méthyle, l'étude de la région des signaux de groupements méthyles a montré que ces esters contenaient également des groupements méthyles secondaires ; par ailleurs, l'importance des signaux vers 130 cps est en faveur de l'existence d'une fonction cétone dans les acides β-mycoliques (7).

Les spectres de R.M.N. des β-kansamycolates de méthyle et β-mycolates de méthyle Test montrent un doublet à 56-63 cps. Il est probable qu'il s'agit du doublet d'un groupement méthyle secondaire porté par le carbone en α du groupement cétonique de ces ceto-esters



Le spectre de R. M. N. des α'-mycolates Test (figure 4) montre un singulet à 198 cps, attribuable aux trois protons du groupement OCH_3, de même intensité que celui dû aux protons du groupement méthyle ester. Un doublet à 45-51,5 cps indique l'existence d'un groupement méthyle secondaire dans la molécule. L'échantillon d'α'-mycolates Test que nous avons, examiné, montre également des signaux attribuables à un cycle propanique.

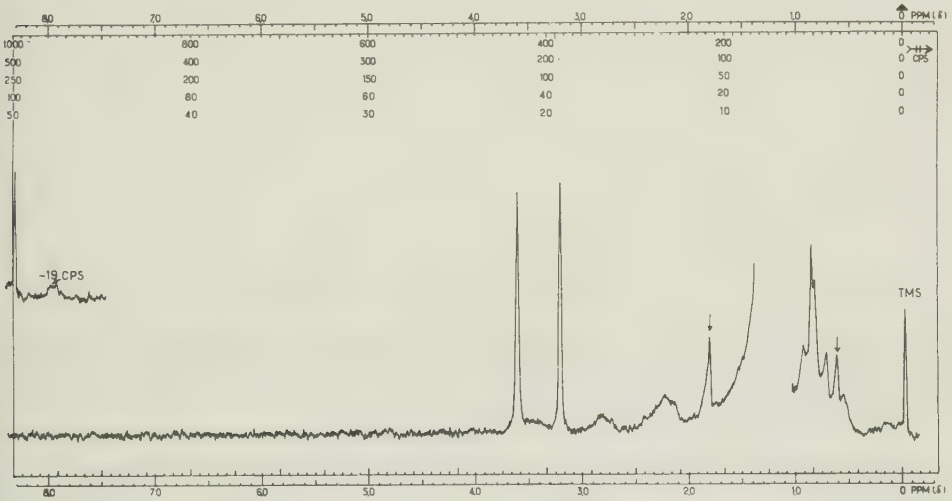


Figure 4 : Spectre de R. M. N. des α'mycolates de méthyle Test.

b) Préparation de dérivés :

Acétylation : Cette réaction est fort utile dans la détermination du nombre d'hydroxyles d'un acide mycolique. Après acétylation on soumet les acétylmycolates de méthyle d'une part à l'analyse élémentaire et d'autre part à la spectrométrie de R. M. N. Le pourcentage d'oxygène et la comparaison des surfaces des singulets dus aux groupements méthyles $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-OCH_3$ et $CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-$ fixent le nombre d'hydroxyles (figures 5)(*).

(*) La déshydratation, au cours de l'acétylation des mcyolates de méthyle a été rapportée (8) ; nous n'avons pas observé de déshydratation au cours de nos expériences (pour les conditions opératoires voir chapitres III, IV et V).

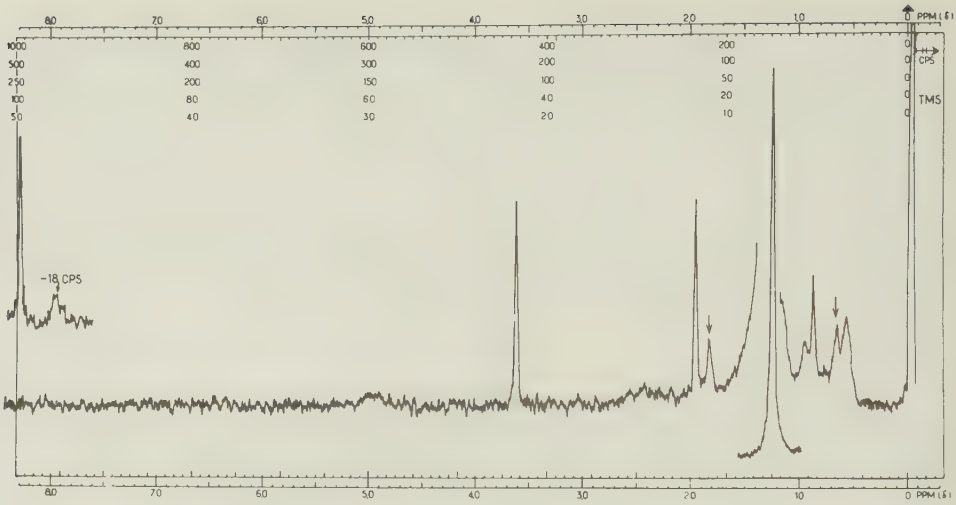


Figure 5 : Spectre de R. M. N. des acétyl-α-mycolates Test.

L'ozonolyse de l'acétate peut être utile dans le cas de mycolates insaturés. La comparaison des produits d'ozonolyse de l'acétate et de ceux de méromycolates ou de méromycolals fixe la nature des fragments insérés au carbone portant le groupement acétoxy (voir chapitre III).

Méromycolals : L'aldéhyde méromycolique peut être préparé par la pyrolyse :

$$R_2 - CH(OH) - CH(R_1) - COOH_3 \longrightarrow R_2 - CHO + CH_2(R_1) - COOH_3$$

Cet aldéhyde a été isolé dans le cas d'α-smegmamycolates de méthyle, d'α-mycolates de méthyle Test, d'α'-mycolates Test (9) et de β-smegmamycolates de méthyle (7), ou directement oxydé en acide méromycolique dans le cas de nocardates de méthyle et d'α-kansamycolates de méthyle.

Le spectre I. R. des aldéhydes meromycoliques montre une bande C = 0 vers 1737 cm^{-1} et une bande à 2723 cm^{-1} environ due à la vibration CH du groupement aldéhyde (figure 6).

Le spectre de R. M. N. des méromycolals est intéressant à observer. Des renseignements peuvent être tirés de la nature des signaux dus au proton aldéhydique (absorption vers 585 cps). C'est ainsi que l'observation d'un triplet à 585 cps sur le spectre des α-méromycolals Test montre qu'il y a deux protons sur le carbone en α et que, par conséquent, il n'y a pas de ramification sur le carbone en γ des α-mycolates de méthyle Test (figure 7).

Méromycolates de méthyle : Par oxydation des aldéhydes méromycoliques par Ag_2O alcalin (10) on obtient les acides méromycoliques que l'on estérifie par le diazométhane en méromycolates de méthyle. Le spectre I. R. de ces composés est à considérer avec attention. La spectrométrie I. R. nous a permis (7) de montrer par l'observation d'une bande à 1724 cm^{-1} environ, que les acides β-mycoliques étaient en général cétoniques (figure 8) ; sur le spectre

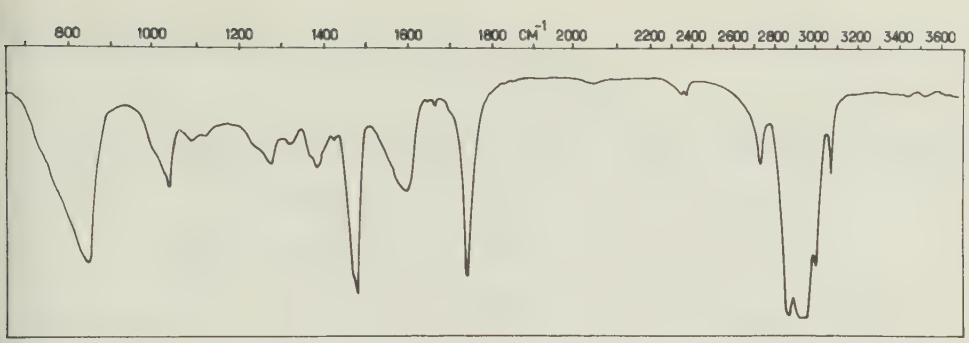


Figure 6 : Spectre I.R. des α-méromycolals Test.

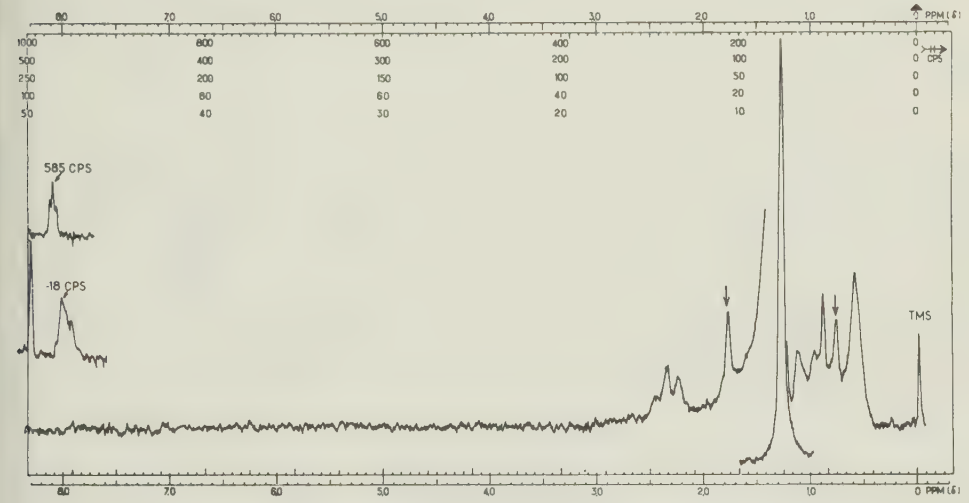


Figure 7 : Spectre de R.M.N. des α-méromycolals Test.

de mycolates de méthyle cette bande est masquée par celle également à 1724 cm^{-1} environ, due au C = 0 chelaté, commune à tous les mycolates. Les α-méromycolates de méthyle ne présentent qu'une seule bande C = 0 ester vers 1747 cm^{-1} ; par exemple, la figure 8 représentant le spectre I.R. des β-kansaméromycolates de méthyle est à comparer avec le spectre d'α-kansaméromycolates de méthyle (figure 9) ; mais l'intérêt essentiel de la préparation de méromycolates réside dans le fait que l'interprétation du spectre de masse de ces esters revient en fait à celle des esters méthyliques d'acides gras à très longue chaîne. L'application de cette technique nous a permis de déterminer clairement la structure du squelette carboné des acides nocardiaques et d'avoir des renseignements intéressants sur celle des acides mycoliques.

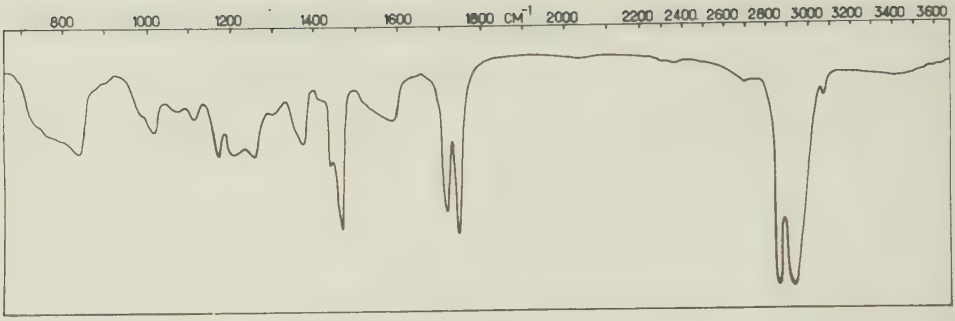


Figure 8 : Spectre I.R. des β-kansaméromycolates de méthyle.

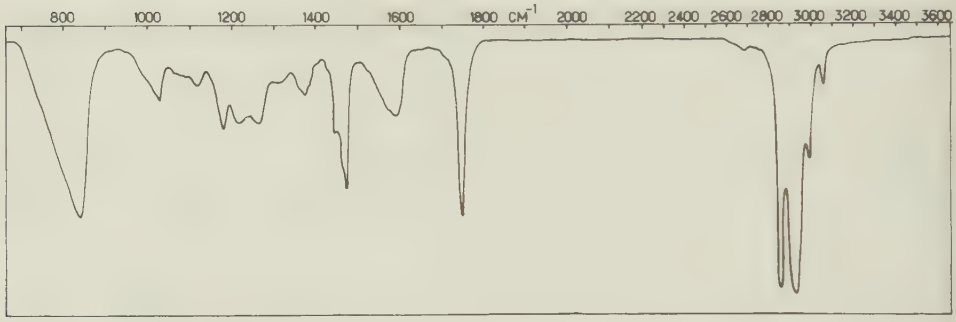


Figure 9 : Spectre I.R. des α-kansaméromycolates de méthyle.

BIBLIOGRAPHIE

(1) R.J. ANDERSON - Fortschr. Chem. Organ. Naturst., 3, 145 (1939).

(2) J. ASSELINEAU - Thèse d'Etat. Paris, 1950 : Ed. Arnette, 1951.

(3) A. AEBI, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 661 (1953).

(4) R. CLERMONTE et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci., 242, 2600 (1956).

(5) G. LANEELLE - C.R. Acad. Sci., 257, 781 (1963).

(6) E.D. MORGAN et N. POLGAR - J. Chem. Soc., 3779 (1957).

(7) A.H. ETEMADI et O. TORQUEBIAU - résultat inédit.

(8) M. BARBIER - thèse de doctorat. Paris, 1954.

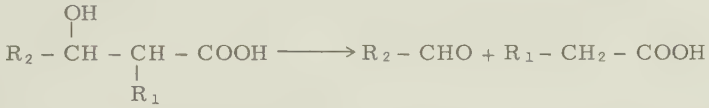
(9) A.H. ETEMADI et J. GASCHE - résultat inédit.

(10) F. ASINGER - Ber., 75, 656, (1942).

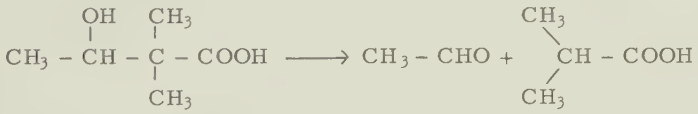
CHAPITRE II

TECHNIQUES MICRO-ANALYTIQUES D'ÉTUDE DE STRUCTURE D'ESTERS α -RAMIFIÉS, β -HYDROXYLÉS CHROMATOGRAPHIE EN PHASE VAPEUR ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE

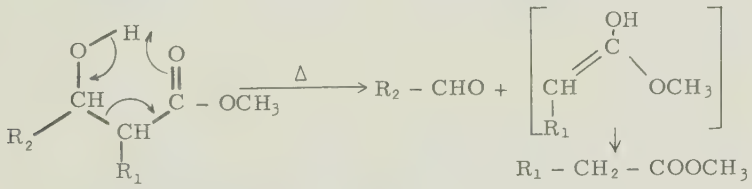
Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les acides mycoliques, acides α-ramifiés, β-hydroxylés, se pyrolysent selon le schéma suivant (1, 2) :



Les acides α-disubstitués, β-hydroxylés se pyrolysent également : le premier exemple de pyrolyse de tels acides est dû à Wallach (3) qui par pyrolyse de l'acide α-,α-diméthyl-β-hydroxybutyrique obtenait de l'acétaldéhyde et de l'acide isobutyrique :



La facilité de la pyrolyse dans le cas des esters α-diméthylés, β-hydroxylés a amené Lapin et Horeau (4) à mettre au point une technique de passage des esters aux aldéhydes, comportant notamment une telle pyrolyse. La pyrolyse des esters α-(mono-ou di-) ramifiés, β-hydroxylés peut être considérée comme un exemple d'un mécanisme général de l'effet thermique qui régit certaines réactions de fragmentation (décarboxylation de β-diacides et de β-céto-acides et la scission de β-céto-alcools (5)) et de transposition (transposition de Claisen) : le transfert électronique circulaire et concerté ; la réaction de pyrolyse peut dans ce cas s'écrire de la manière suivante :



Différents genres bactériens (Mycobactéries, Nocardia, Corynébactéries) produisent des acides α-ramifiés, β-hydroxylés. L'étude systématique des produits de pyrolyse de ces acides a été effectuée (voir par exemple 2, 6, 7, 8). Cependant, si l'isolement de l'acide provenant de la pyrolyse ne présente aucune difficulté, l'aldéhyde a été moins étudié.

Comme nous le verrons au chapitre III nous avons isolé les aldéhydes de pyrolyse des α-smegmamycolates de méthyle. La nature aldéhydique des produits obtenus a été démontrée par des méthodes physiques et par leur oxydation en acides méromycoliques par Ag_2O alcalin. Les aldéhydes de pyrolyse ont été également isolés dans le cas de β-smegmamycolates de méthyle (9), d'α-mycolates Test (chapitre V), d'α'-mycolates Test (10). Dans le cas de mycolates, nocardates et corynomycolates que nous avons étudiés, nous avons constamment utilisé les aldéhydes de pyrolyse, soit après leur purification, soit après leur oxydation en acides (voir les chapitres suivants).

Etant donné que la connaissance de la structure de l'ester et de l'aldéhyde provenant de la pyrolyse équivaut à la connaissance de la structure d'un ester α-ramifié β-hydroxylé (abstraction faite de la stéréochimie) nous nous sommes intéressés au comportement de ces esters en chromatographie en phase vapeur et en spectrométrie de masse, en les chauffant, dans les deux cas, à l'introduction. La spectrométrie de masse des esters α-ramifiés, β-hydroxylés qui ne se pyrolysent pas dans les conditions opératoires choisies a également été étudiée ; dans certains cas nous avons soumis nos échantillons à la pyrolyse préalable dans un tube à boules.

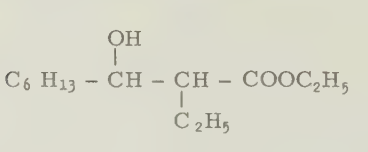
I - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE VAPEUR DES ESTERS α-RAMIFIES, β-HYDROXYLES

La "chromatographie pyrolytique" a jusqu'à présent été utilisée, surtout dans l'étude des polymères (11 à 20) ; des barbituriques (21 et 22) et des hydrocarbures (23) ont également été étudiés par cette technique ; récemment, l'étude par chromatographie pyrolytique des plastifiants (24) ainsi que des alcaloïdes indoliques (25) a été rapportée. La pyrolyse a été effectuée soit en vase clos, soit en utilisant un four de pyrolyse, ou un filament chauffant disposé en tête de la colonne de chromatographie. Nous nous sommes servi de deux moyens pour pyrolyser nos produits :

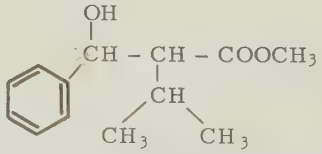
A - PYROLYSE DANS LA CHAMBRE D'INTRODUCTION -

Dans ce cas c'est la chambre d'introduction d'un chromatographe (F et M ou chromagaz(*), chauffée à 280°, qui sert de réacteur. Les produits sont entrainés par l'hélium sur une colonne de silicone. Deux cas se présentent :

a) celui des composés tels que l'α-éthyl, β-hydroxynonanoate d'éthyle (I) et l'α-isopropyl, β-hydroxy, β-phényl-propionate de méthyle (II), qui donnent un seul pic à la chromatographie :



I



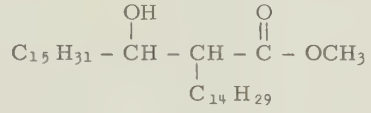
II

(*) Cet appareil muni d'un détecteur à ionisation de flamme a été mis au point à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette par MM. R. Galinaro et D. Mercier.

Ces composés, "trop volatils", ne se sont pas pyrolysés dans nos conditions opératoires.

b) dans le cas du corynomycolate de méthyle (de *C. diphtheriae)* (8), du nocardate de méthyle (de *N. asteroides)* (7) et des α-smegmamycolates de méthyle (de *M. smegmatis)* c'est le chromatogramme des produits de pyrolyse qui est obtenu.

1/ Chromatographie pyrolytique du corynomycolate de méthyle(*) (III)



III

Deux pics sont observés sur le chromatogramme (figure 1). Le produit du premier pic de la chromatographie est récupéré à la sortie de la colonne et oxydé par MnO_4K selon Cason et Miller (26). L'acide obtenu est traité par le diazométhane et chromatographié de nouveau en phase vapeur ; il s'agit du palmitate de méthyle. Le produit du premier pic est donc l'aldéhyde palmitique attendu.

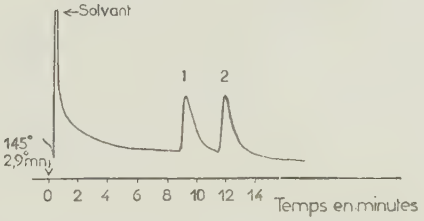
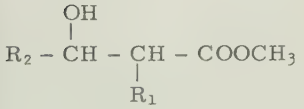


Figure 1 : Chromatographie pyrolytique du corynomycolate de méthyle (III) :
1/ aldéhyde palmitique,
2/ palmitate de méthyle,

Le deuxième pic est celui du palmitate de méthyle ; sa récupération à la sortie de l'appareil suivie de la cochromatographie avec le palmitate de méthyle donne un seul pic ; il est intéressant de noter que la cochromatographie du corynomycolate de méthyle et du palmitate de méthyle donne un seul pic pour ce dernier composé, ce qui indique que la pyrolyse a bien eu lieu à l'introduction.

2/ Chromatographie pyrolytique des nocardates de méthyle (IV).



IV

(R_1 = $C_{10}H_{21}$, $C_{12}H_{25}$ et $C_{14}H_{29}$

R_2 = divers radicaux, deux et trois fois insaturés en C_{31}, C_{33}, C_{35} et C_{37}.)

(*) Nous remercions vivement M. le Professeur J. Asselineau (Toulouse) de nous avoir fourni un échantillon d'acide corynomycolique.

Sept pics sont observés sur le chromatogramme (figure 2). Les trois premiers sont identifiés par leur temps de rétention au laurate, myristate et palmitate de méthyle.

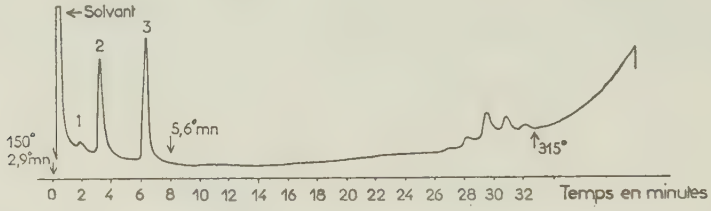
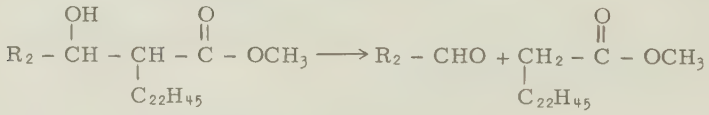


Figure 2 : Chromatographie pyrolytique des nocardates de méthyle (IV)
1/ laurate de méthyle,
2/ myristate de méthyle,
3/ palmitate de méthyle.
Les quatres autres pics représentent les aldéhydes méronocardiques.

Quatre autres pics de temps de rétention très supérieur sont également observés. Nous avons récupéré les produits de ces quatre pics et les avons oxydés par Ag_2O selon Asinger (27) ; les acides obtenus sont traités par le diazométhane et cochromatographiés avec les nocardates de méthyle. Les temps de rétention des produits oxydés et méthylés sont supérieurs à ceux des pics provenant de la pyrolyse des nocardates. Ces quatre pics représentent donc les aldéhydes méronocardiques (R_2CHO) attendus. La chromatographie pyrolytique nous a ainsi permis, pour la première fois, de montrer la pluralité du substituant R_2 dans des esters α-ramifiés, β-hydroxylés d'origine naturelle. Cette diversité semble être de règle chez tous les acides de ce genre rencontrés chez les Mycobactéries, Nocardia et Corynébactéries.

3/ Chromatographie pyrolytique des α-smegmamycolates de méthyle (V).



V

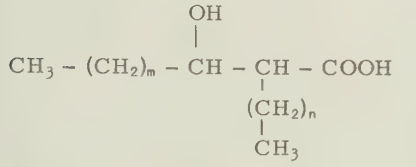
(R_2 = divers radicaux deux fois insaturés, essentiellement en C_{52}, C_{53}, C_{54} et C_{55}).

Dans ce cas, ainsi que dans le cas d'autres mycolates de méthyle de Mycobactéries, le chromatogramme présente un seul pic, celui de l'ester de pyrolyse, l'aldéhyde est trop lourd pour sortir de la colonne dans nos conditions opératoires.

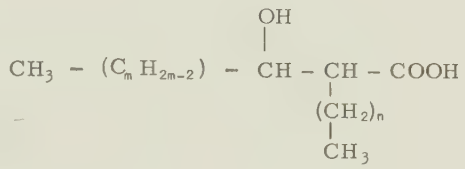
B - PYROLYSE PREALABLE DANS UN TUBE A BOULES

Les esters méthyliques des acides α-ramifiés, β-hydroxylés isolés de différentes espèces de Corynébactéries ont été étudiés par cette technique. Le lecteur peut se reporter au chapitre VIII pour les détails. Voici le principe d'une méthode rapide de détermination de structure des esters α-ramifiés, β-hydroxylés, applicable surtout dans le cas des esters méthyliques d'acides de type corynomycolique : on pyrolyse ces esters dans un tube à boules et

on chromatographie en phase vapeur les produits de pyrolyse sur deux colonnes ; une colonne apolaire et une colonne polaire. On oxyde les produits de pyrolyse par Ag_2O alcalin et on rechromatographie les esters méthyliques des acides obtenus sur les mêmes colonnes. La comparaison des chromatogrammes et éventuellement la spectrométrie de masse des produits recueillis par chromatographie en phase vapeur préparative permettent de déduire les structures recherchées. Ainsi, dans le cas des acides α-ramifiés, β-hydroxylés, isolés de *Corynebacterium 506*, nous avons pu établir les structures (VI) et (VII) :



VI

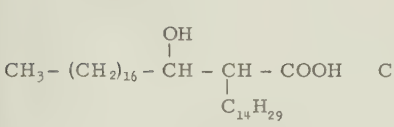


VII

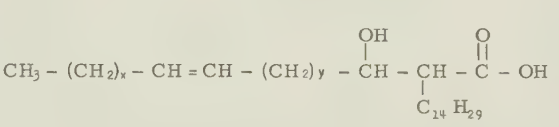
m = 14, 16

n = 11, 13 et 15

Les deux constituants principaux ont les structures (VIII) et (IX)



VIII



IX

x + y = 14

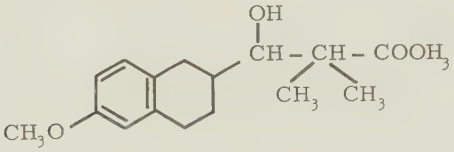
En conclusion, la chromatographie en phase vapeur des esters α-ramifiés, β-hydroxylés constitue une technique simple d'étude de structure de ces produits ; la pyrolyse se fait dans la chambre d'introduction chauffée à 280-300°. Dans le cas de mélanges de produits naturels on peut faire une chromatographie pyrolytique avec pyrolyse préalable des esters dans un tube à boules. Cette manière de faire permet l'oxydation d'un échantillon des produits de pyrolyse et ramène le problème à l'identification d'un mélange d'acides.

II - SPECTROMETRIE DE MASSE DES ESTERS α-RAMIFIES, β-HYDROXYLES

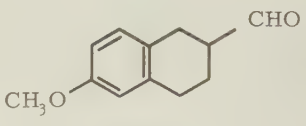
La pyrolyse délibérée (28) des produits avant de les soumettre à la spectrométrie de masse a été utilisée surtout pour l'étude des polymères (29, 30, 31). On a employé, soit un four, soit un filament chauffant pour réaliser la pyrolyse. Dans nos expériences nous n'avons pas utilisé de dispositif particulier ; les produits sont chauffés à l'introduction. Schématiquement, deux cas sont observés : celui des esters α-ramifiés, β-hydroxylés qui subissent la pyrolyse avant d'entrer dans la région d'ionisation et celui des esters qui ne subissent pas cette pyrolyse. L'étude du cas particulier des mycolates de méthyle, de hauts poids moléculaires, nécessitant l'utilisation d'un système d'introduction directe sera rapportée à part.

a) Spectrométrie de masse des produits subissant la pyrolyse.

Dans ce cas le spectre obtenu est la superposition de deux spectres, celui de l'aldéhyde et celui de l'ester provenant de la pyrolyse, à condition que l'un et l'autre de ces composés soient assez volatils pour s'acheminer dans la région d'ionisation : c'est ainsi que le spectre d'α-α-diméthyl, β-hydroxy, β-(méthoxy-6-tetrahydro 1, 2, 3, 4 naphtyl-2)-propionate de méthyle (X) (figure 3a) montre celui de l'aldéhyde (XI)(*) (figure 3b) et celui de l'isobutyrate de méthyle.



X



XI

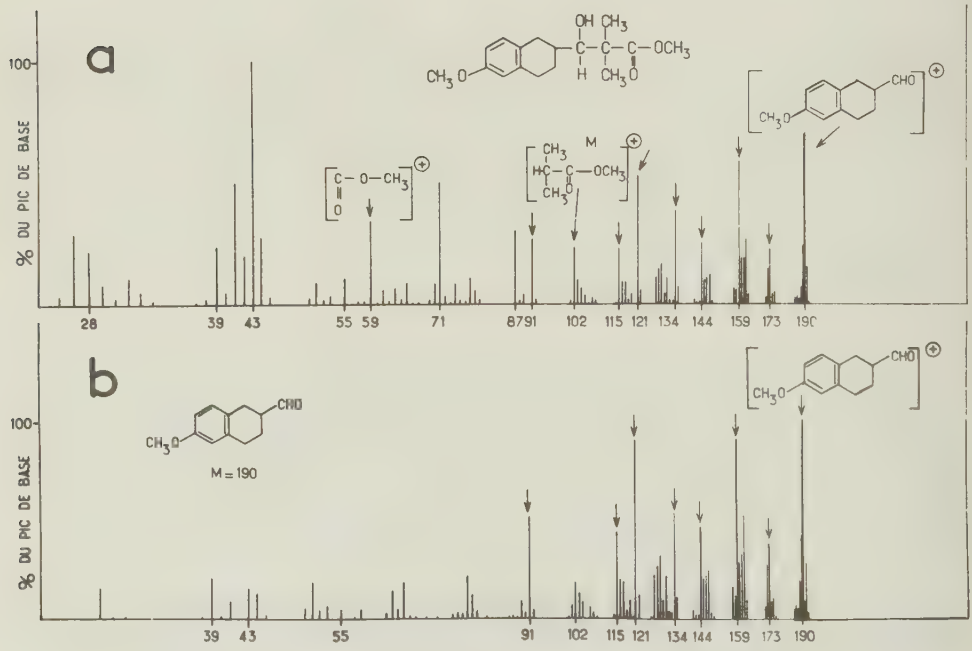


Figure 3 : a) spectre de masse du composé X.
b) spectre de masse de l'aldéhyde XI.

(*) Les produits I, X et XI nous ont été fournis par M. le Professeur A. Horeau et M. H. Lapin. Nous les en remercions vivement. Nous sommes particulièrement reconnaissants à M. le Professeur Horeau d'avoir bien voulu faire synthétiser le produit I dans son laboratoire, spécialement pour cette étude.

Le spectre de masse du corynomycolate de méthyle (figure 4a) montre également la superposition de deux spectres, celui du palmitate de méthyle et celui de l'hexadecanal (figure 4b). La présence du spectre de ce dernier est mis en évidence, d'une part par l'observation d'une série de pics à m/e = 82, 96, 110, 124, 138 etc ..., et d'autre part l'existence d'un pic à m/e = 196 = M-44, d'un pic (de très faible intensité) à m/e = 212 = M-28 et d'un pic à m/e = 222 = M-18.

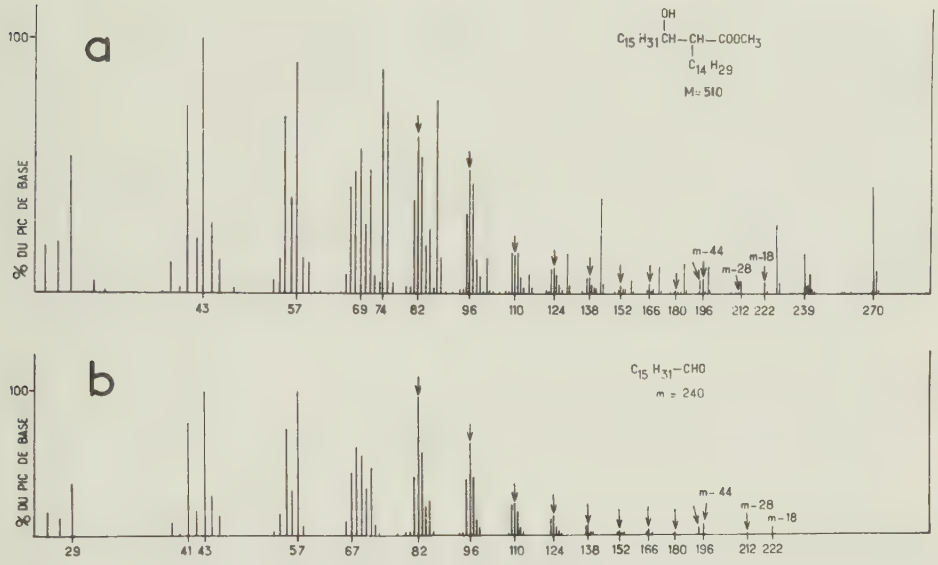


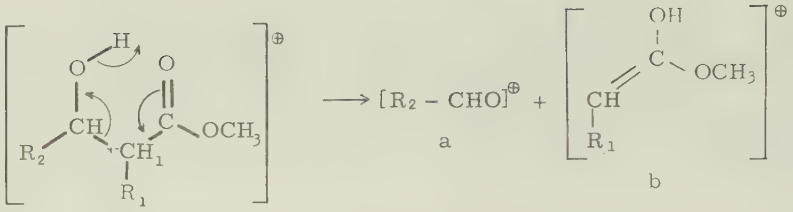
Figure 4 : a) spectre de masse du corynomycolate de méthyle (III).
b) spectre de masse de l'aldéhyde palmitique.

Le pic moléculaire, ainsi qu'on le voit sur le spectre de l'aldéhyde palmitique témoin, n'est visible que si on effectue le spectre à grande sensibilité. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gilpin et McLafferty (32) qui ont étudié le spectre de masse d'aldéhydes saturés jusqu'à C_{14}.

Nous verrons plus loin que le pic à m/e = M-18 qui est dans le cas de l'aldéhyde palmitique de plus faible intensité que celui à m/e = M-44 prend une grande importance dans les aldéhydes saturés à hauts poids moléculaires, alors que le pic à m/e = M-44 perd de l'intensité. Dans le cas des aldéhydes lourds insaturés ou comportant des cycles propaniques les pics moléculaires des aldéhydes sont observés. Les pics à M-18 sont dans ce cas de plus faibles intensités.

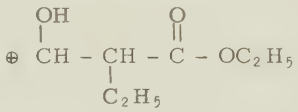
b) Spectre de masse des esters α-ramifiés, β-hydroxylés qui ne subissent pas de pyrolyse, avant d'être acheminés dans la région d'ionisation :

Dans ce cas nous avons choisi les conditions opératoires et les produits de telle façon que ces derniers entrent dans la région d'ionisation. Le spectre de masse de ces produits peut s'expliquer en tenant compte du réarrangement de l'ion moléculaire selon le schéma suivant :



La charge positive reste, en général, principalement avec le fragment (b), sauf si la nature de R_2 est telle que l'aldéhyde provenant du réarrangement stabilise la charge positive. Les exemples suivants sont en faveur de cette proposition :

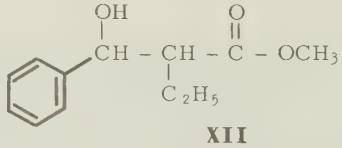
- Le spectre de masse de l'α-éthyl, β-hydroxy-nonanoate d'éthyle (I) (figure 5) présente un pic à m/e = 116, qui correspond au pic moléculaire du butyrate d'éthyle. Ce pic constitue ici le pic de base du spectre ; ce fait indique déjà que la pyrolyse préalable de la molécule n'est pas à incriminer puisque le pic de base du butyrate d'éthyle est à m/e = 43 et le rapport des intensités des pics à m/e = 116 et m/e = 43 est égal à 4,36/100 (33) ; d'ailleurs des pics à m/e = 145 attribuables à l'ion (c) et à m/e = 201 (= M-29)



c

existent sur le spectre ; ces faits indiquent également que la molécule d'ester-α-ramifies, β-hydroxylé, est entrée dans la région d'ionisation.

- Le spectre de masse de l'α-éthyl, β-hydroxy β-phényl-propionate de méthyle(*) (XII) présente le pic moléculaire (m/e = 106) et d'autres pics du



XII

spectre de l'aldéhyde benzoïque (figure 6). L'existence d'un pic à m/e = 102 indique que la charge s'est distribuée entre les deux fragments provenant du réarrangement de l'ion moléculaire de l'ester α-ramifié β-hydroxylé. L'importance des pics de l'aldéhyde s'explique par la forte conjugaison que présente l'aldéhyde benzoïque, ce qui stabilise la charge positive. Ici encore, une pyrolyse préalable n'est pas à incriminer étant donné l'existence du pic

---

(*) Les produits II et XII nous ont été fournis par le Dr. J. Jacques et Mme J. Canceill ; nous les en remercions vivement.

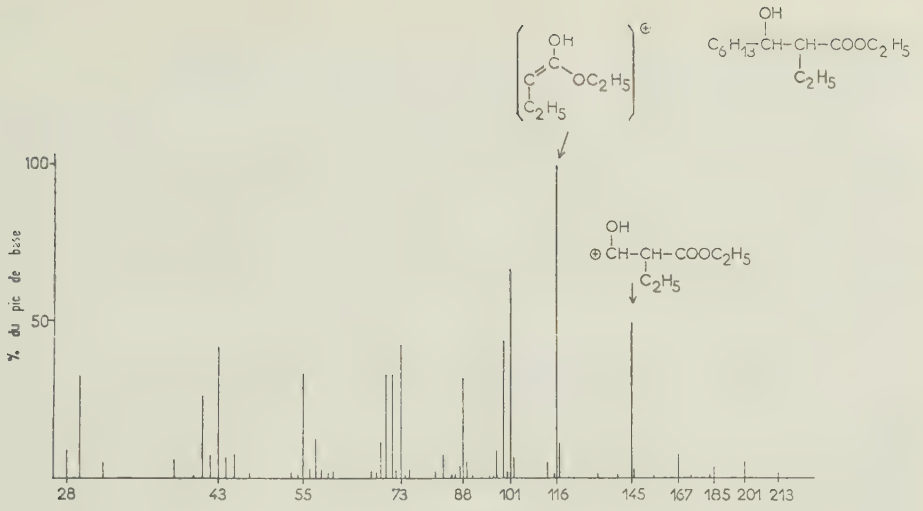


Figure 5 : spectre de masse de l'α-éthyl, β-hydroxy-nonanoate d'éthyle (I).

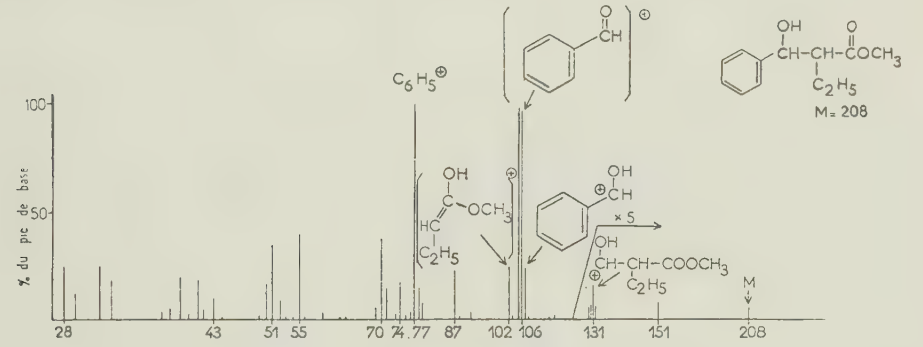
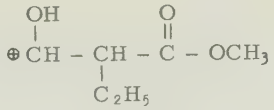


Figure 6 : spectre de masse d'α-éthyl, β-hydroxy, β-phényl propionate de méthyle (II).

à m/e = 131 dû à l'ion (d)(•) et du pic moléculaire de l'ester α-ramifié, β-hydroxylé à m/e = 208. La comparaison des intensités des pics à m/e = 102 et à m/e = 43, indique également que le premier de ces pics ne peut provenir, pour l'essentiel du moins, d'une molécule de butyrate de méthyle formée par



d

(•) L'existence d'un pic dû à un ion de type (d) est mentionnée par Ryhage et Stenhagen (34) pour le cas des esters β-hydroxylés ne portant pas de ramification en α. Un tel pic que nous retrouvons dans les esters β-hydroxylés qui ne se pyrolysent pas, n'existe évidemment pas sur les spectres des produits qui ont subi la pyrolyse préalable à l'introduction, comme nous l'avons vu au paragraphe précédent.

pyrolyse préalable de l'ester α-ramifié β-hydroxylé. Le rapport des intensités des pics à m/e = 102 et à m/e = 43 est égal à 1,86/100 (35) dans le cas de butyrate de méthyle.

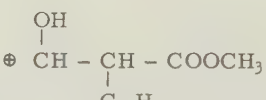
c) Spectre de masse des esters α-ramifiés, β-hydroxylés à hauts poids moléculaires (mycolates de méthyle) : Utilisation d'un système d'introduction directe.

Dans le cas des mycolates de méthyle de Mycobactéries, l'utilisation d'un appareil à introduction directe et à double focalisation (MS9) nous a permis d'avoir des renseignements sur la nature des aldéhydes et des esters qui dans ce cas peuvent se former par l'un des deux mécanismes mentionnés ci-dessus :

1/ Spectre de masse d'α-smegmamycolates de méthyle : La figure 7 (a, b et c) reproduit une partie du spectre d'α-smegmamycolates de méthyle. Dans la région des pics de masses les plus élevées on observe des pics à m/e = 1104, 1118, 1132, 1146 et 1160 (figure 7a) ; des pics d'homologues inférieurs et supérieurs existent également mais sont de faibles intensités. Ce sont les pics moléculaires d'anhydro-mycolates de méthyle. La série de pics à m/e = 712 à 824 (figure 7b) est attribuable aux pics moléculaires d'aldhéhydes α-smegma-méromycoliques. Les pics à M-18, (par exemple le pic à m/e = 764 pour l'aldéhyde de masse moléculaire 782) ainsi que les pics à M-44 (par exemple le pic à m/e = 738 pour le même aldéhyde) n'ont pas une importance significative.

A titre de comparaison nous rapportons ici une partie du spectre des α-smegma-méromycolates de méthyle. Les pics moléculaires se trouvent à m/e = 742 à 854 ce qui est en accord avec l'attribution des pics à m/e = 712 à 824 sur le spectre d'α-smegmamycolates de méthyle aux aldéhydes méromycoliques. La signification des pics à m/e = 474 à 572 qui existent sur le spectre des mycolates de méthyle (figure 7c) et des mêmes pics ou homologues sur le spectre d'α-méromycolates (figure 7e) est commentée dans le chapitre consacré à la structure des acides α-smegmamycoliques (voir chapitre III).

Sur le spectre des α-smegmamycolates de méthyle on observe le pic moléculaire de l'ester de pyrolyse à m/e = 382 ; un pic à m/e = 351 = M-31 et un autre à m/e = 339 = M-43 existent également sur ce spectre. On trouve également un pic à m/e = 411, il est attribuable à l'ion (e) :



(e)

ce qui indique que des molécules d'α-smegmamycolates de méthyle ont atteint la région d'ionisation avant d'avoir subi la pyrolyse.

2/ Spectre de masse d'α-kansamycolates de méthyle : Dans la région des pics de masses les plus élevées sur le spectre d'α-kansamycolates de méthyle on observe des pics à m/e = 1132, 1160 et 1188 (figure 8a). Ces pics correspondent aux pics moléculaires d'anhydro-mycolates de méthyle.

(*) Nous remercions le Dr. M. Barber d'avoir effectué ces mesures.

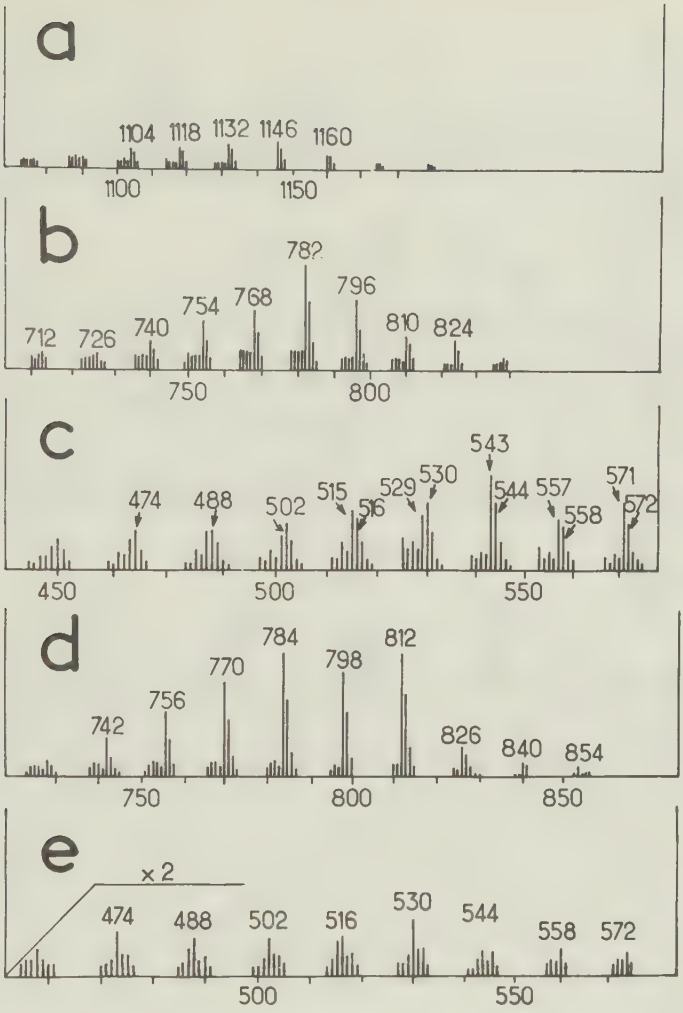


Figure 7 : a, b et c : spectre de masse des α-smegmamycolates de méthyle,
d et e : spectre de masse des α-smegma-méromycolates de méthyle.

Sur ce spectre il existe des pics à m/e = 768, 796 et 824 (figure 8b) attribuables aux aldéhydes méromycoliques. Il s'agit ici des pics moléculaires. Pour le confirmer nous avons préparé les méromycolates de méthyle dont un fragment du spectre de masse est rapporté ici. Les pics moléculaires se trouvent à m/e = 798, 826 et 854 (figure 8d). On constate la correspondance parfaite entre les valeurs de masses moléculaires des méromycolates et des méromycolals (798-768 = 30, 826-796 = 30 et 854-824 = 30).

Notons également sur le spectre d'α-kansamycolates de méthyle des pics de faibles intensités à m/e = 750, 778 et 806. Ces pics correspondent à M-18 pour les aldéhydes méromycoliques, mais on notera ici encore l'absence de pic à m/e = M-44.

Sur le spectre d'α-kansamycolates de méthyle on observe également une

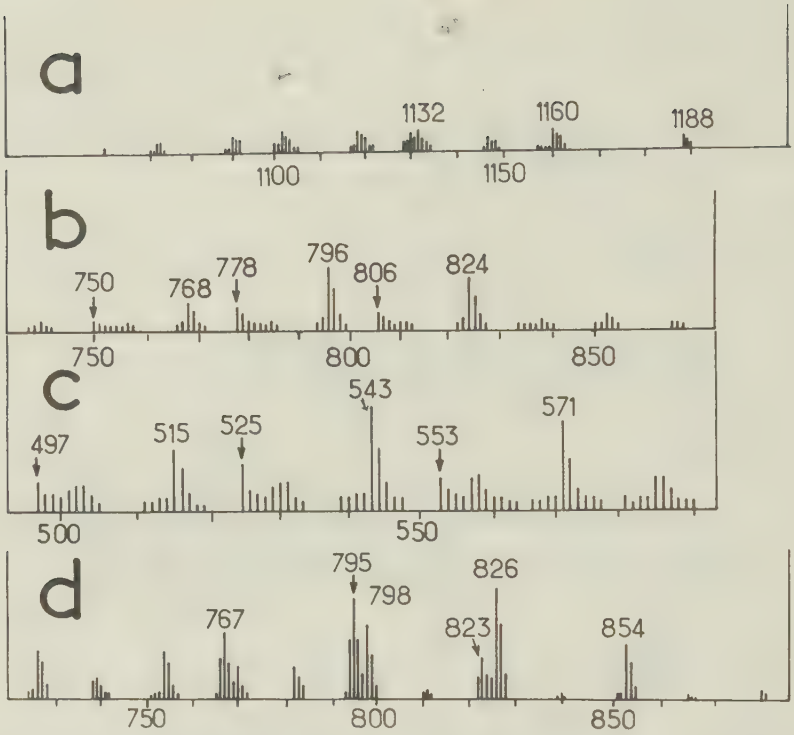


Figure 8 : a, b et c : spectre de masse des α-kansamycolates de méthyle.
d : spectre de masse des α-kansa-méromycolates de méthyle.

série de pics à m/e = 515, 543 et 571 ; la signification de ces pics sera discutée au chapitre IV. On observe aussi les pics de l'ester de pyrolyse (tétracosanoate de méthyle). L'absence du pic à m/e = 411 indique que dans ce cas les kansamycolates de méthyle se sont pyrolysés, ce spectre ayant été effectué à 260°.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE VAPEUR

La chromatographie en phase vapeur du corynomycolate de méthyle a été effectuée sur une colonne de silicone DC 550 à 5 % ; le chromosorb est utilisé comme support. Longueur de la colonne : 2,50 m, diamètre intérieur : 4 mm, gaz vecteur : hélium (4 l/h), température à l'introduction : 280°, température de la colonne : 145°, avec un programme de 2,9°/mn.

La chromatographie en phase vapeur du nocardate de méthyle a été effectuée sur une colonne de silicone SE 30 à 3 % ; le chromosorb est utilisé comme support. Longueur de la colonne : 1,50 m, diamètre intérieur : 4 mm, gaz vecteur : hélium (5 l/h), température à l'introduction : 280°, température de la colonne : 150° à l'injection, avec un programme de 2,9°, puis de 5,6°/mn.

SPECTROMETRIE DE MASSE

Les spectres de masse ont été effectués avec un spectromètre CH4-Atlas. Potentiel d'ionisation : 70 V. température de la source d'ionisation : 270°, température à l'introduction : 260-280° pour les produits qui se pyrolysent. Pour les produits volatils les spectres ont été effectués à différentes températures. Les figures 3 et 4 représentent les spectres obtenus à 180 et 120°, respectivement.

OXYDATION DES ALDEHYDES

a) Oxydation de l'aldéhyde palmitique par le permanganate de potassium :

Le produit du premier pic de la chromatographie en phase vapeur du corynomycolate de méthyle (figure 1) est oxydé de la manière suivante ; on dissout 3,6 mg de MnO_4K dans 2 cm^3 d'eau ; on ajoute 8 cm^3 d'acétone ; on dissout 2 mg d'aldéhyde dans 2 cm^3 d'acétone ; on mélange les deux solutions et on agite à 25° pendant 2 h 1/2. On ajoute alors quelques gouttes de méthanol et on agite encore pendant une demi-heure. On acidifie le mélange et on extrait à l'éther : on obtient 2,2 mg de produit, que l'on traite avec le diazométhane.

b) Oxydation des meronocardals par l'oxyde d'argent alcalin.

A 5 cm^3 d'une solution de soude à 10 %, on ajoute 50 mg de nitrate d'argent ; on agite le mélange en chauffant à 90° ; on dissout les meronocardals (3,2 mg) dans 0,3 cm^3 d'éther. Cette solution est introduite goutte à goutte dans le mélange oxydant. On continue l'agitation et le chauffage à 90° pendant 4 h. On laisse refroidir, on acidifie avec l'acide nitrique dilué, on extrait rapidement l'étherosoluble que l'on amène à neutralité et sèche sur SO_4Na_2. On obtient 2,8 mg de produit que l'on traite avec le diazométhane.

BIBLIOGRAPHIE

(1) F.H. STODOLA, A. LESUK et R.J. ANDERSON - J. Biol. Chem., 128, 505 (1938).

(2) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Nature, 166, 782 (1950).

(3) O. WALLACH - Ann., 365, 255, (1909).

(4) H. LAPIN et A. HOREAU - Gazz. Chim. Ital., 93, 451 (1963).

(5) S. OLSON, E. AALRUST et H. BLOM - Ber. 90, 765 (1957).

(6) M. BARBIER et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 14, 246 (1960).

(7) G. MICHEL, C. BORDET et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci., 250, 3518 (1960).

(8) E. LEDERER et J. PUDLES - Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 1103 (1951).

(9) A.H. ETEMADI, O. TORQUEBIAU - Résultat inédit.

(10) A.H. ETEMADI, J. GASCHE - Résultat inédit.

(11) S. Le GHISA et G.A. CARAZZOLO - Anal. Chim. Roma, 49, 1621 (1959).

(12) J. HASLAM et A.R. JEFFS - Chem. and Ind., 722 (1959).

(13) G. De ANGELLIS, P. IPPOLITI et N. SPINA - La Ricerca Scientifica, 28, 1444 (1958).

(14) H. FEUERBERG et H. WEIGEL - Kautschuk, Gummi und Kunststoffe, 15, 276 (1962).

(15) S.B. MARTIN et R.W. RAMSTAD - Anal. Chem., 33, 982 (1961).

(16) R.S. PORTER, A.S. HOFFMANN et F.J. JOHNSON, Anal. Chem., 34, 1179 (1962).

(17) R.S. LEHRLE et J.C. ROBB - Nature, 183, 1671 (1959).

(18) E.A. RADELL et H.C. STRUTZ - Anal. Chem., 31, 1890 (1959).

(19) G.P. HAPP et D.P. MAIER - Anal. Chem., 36, 1678 (1964).

(20) B. GROTEN - Anal. Chem., 36, 1206 (1964).

(21) J. JANAK - Nature, 185, 684 (1960).

(22) D.F. NELSON et P.L. KIRK - Anal. Chem. 36, 875 (1964).

(23) A.I.M. KEULEMANS et S.G. PERRY - Nature, 193, 1073 (1962).

(24) J. ZULAICA - thèse de Doctorat. Paris 1964.

(25) G. Van BINST, L. DENOLIN-DEWAERSEGGER et R.H. MARTIN - J. Chromatog., 16, 34 (1964).

(26) J. CASON et W.T. MILLER - J. Biol. Chem., 238, 883 (1963).

(27) F. ASINGER - Ber., 75, 656 (1942).

(28) K. BIEMANN - Mass Spectrometry, Mc Graw-Hill Book Cy. Inc., New York (1962).

(29) S.L. MADORSKY et S. STRAUSS - J. Research Natl. Bur. Standards, 40, 417 (1948).

(30) P. BRADT et F.L. MOHLER - J. Research Natl. Bur. Standards, 55, 323 (1955).

(31) P.D. ZEMANY - Anal. Chem., 24, 1709 (1952).

(32) J. GILPIN et F.W. McLafferty - Anal. Chem., 29, 990 (1957).

(33) Catalog of Mass Spectral Data, American Petroleum Inst. Research, project 44, Carnegie Institute of Technology, Pittsburg 13, Pennsylv., U.S.A. Spectre n° 395 (1959).

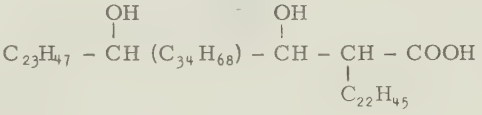
(34) R. RYHAGE et E. STENHAGEN - In F.W. McLafferty, Mass Spectrometry of Organic ions, Academic Press, New York and London 1963 P 436.

(35) Catalog of Mass Spectral Data. American Petroleum Inst. Research, project 44, Carnegie Institute of Technology, Pittsburg 13, Pennsylv., U.S.A. Spectre n° 392 (1959).

CHAPITRE III

SUR LA STRUCTURE DES ACIDES α-SMEGMAMYCOLIQUES

Un acide α-smegmamycolique a déjà été étudié (1) ; la structure I lui a été attribuée.



I

Ayant comme but l'étude de la biogénèse de cet acide (voir chapitre VI) nous en avons repris la structure ; les résultats obtenus montrent, qu'en fait, nous sommes en présence d'un mélange d'acides homologues. Nous utiliserons dorénavant le pluriel pour désigner "un" acide α-smegmamycolique.

L'étude de ce mélange nous a conduits à la structure générale IIa pour les acides α-smegmamycoliques.

ISOLEMENT ET PROPRIETES

On saponifie soit les cires C, soit le mélange de cires C et D ou encore on traite les corps bacillaires par la potasse méthanolique. Les acides obtenus sont d'abord fractionnés en acides inférieurs et acides mycoliques, selon Clermonté et Lederer (2). On traite alors le mélange d'acides mycoliques bruts par le diazométhane et on chromatographie soit sur l'acide silicique, soit sur le gel de silice. Dans la partie expérimentale nous avons rapporté une chromatographie sur gel de silice (chromatographie I, page 48). La figure 1 montre la composition du mélange avant cette chromatographie. Quatre groupes de mycolates de méthyle sont mis en évidence, par ordre d'élution on trouve : les pré α-smegmamycolates de méthyle qui constituent une faible proportion ; les α-smegmamycolates de méthyle (environ 60 % des mycolates), les α'smegmamycolates de méthyle (environ 25 %) et les β-smegmamycolates de méthyle (environ 15 %).

Il est à noter que les fractions 47 à 62 de cette chromatographie donnent à l'examen sur couche mince selon Lanéelle (3), une seule tache dont le Rf est égal à celui d'α-smegmamycolates témoins. Leur point de fusion est pratiquement identique (vers 47-51°) pourtant leur pouvoir rotatoire est susceptible de variation (voir tableau 1 page 49). Ce fait est déjà l'indice de l'inhomogénéité des acides α-smegmamycoliques. Dans la plupart des réactions nous avons utilisé le mélange des fractions 47 à 52 : $[\alpha]_0 = +1,4°$. L'analyse de ce mélange est en accord avec la formule $C_{80}H_{156}O_3$.

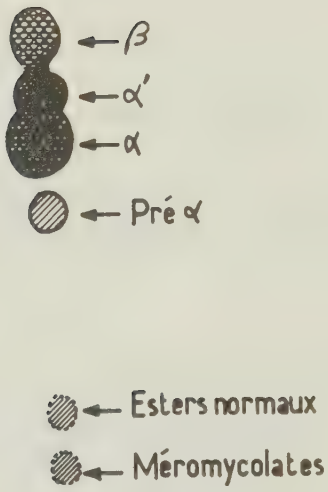


Figure 1 : Chromatoplaque des esters méthyliques des acides mycoliques de *M. smegmatis*. On note la présence des esters normaux et des méromycolates de méthyle.

Le spectre I. R. des α-smegmamycolates de méthyle effectué dans le CCl_4 montre des bandes OH à 3537, 3577 et 3623 cm^{-1}. Ce même spectre mesuré en solution très diluée (0/003M) où les liaisons intermoléculaires disparaissent présente la même allure générale. Ceci montre l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire. On observe le même aspect dans la région d'absorption des OH pour différents mycolates de méthyle que nous avons étudiés (voir chapitre I).

L'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire est encore démontrée clairement par l'étude de la région d'absorption des carbonyles. On observe deux bandes contigües à 1727 et à 1742 cm^{-1}. L'existence de la bande à 1727 cm^{-1} qui disparait sur le spectre des acétyl-α-smegmamycolates de méthyle et d'α-smegma-méromycolates de méthyle est l'indice de l'existence d'une chélation dans la molécule. Le spectre I. R. des α-smegmamycolates de méthyle effectué dans le CS_2 montre une bande à 975 cm^{-1}. Cette bande est attribuable à l'existence d'une double liaison trans dans les molécules.

Spectre de R. M. N. : L'existence de l'insaturation est démontrée par l'étude du spectre de R.M.N. Sur ce spectre on observe un triplet à 316-326 cps J = 5 cps (figure 2 chapitre I). La courbe d'intégration, en prenant comme référence les trois protons du groupement méthyle de l'ester et en tenant compte de l'absorption du proton fixé sur le carbone portant le groupement OH ,

n'a pas permis de déterminer le nombre exact de protons oléfiniques : cette courbe indique seulement la présence de plus d'une insaturation. Or, l'examen des produits de dégradation le montre clairement, et la spectrométrie de masse des méromycolates de méthyle et des mycolates de méthyle le confirme sans ambiguité : il y a deux insaturations dans les acides α-smegmamycoliques. L'étude du spectre de R. M. N. des dérivés de ces acides montre également l'existence de plus d'une double liaison.

Une autre région intéressante sur le spectre de R. M. N. est celle des signaux des protons des groupements méthyles : l'étude quantitative est rendue difficile à cause du grand nombre de $-CH_2-$ et la proximité de l'énorme pic qui leur est attribuable. Qualitativement, comme nous l'avons vu au chapitre I, l'existence d'un signal à 58 cps (doublet à 52-58 cps) est en faveur de l'existence d'un groupement méthyle secondaire de type :

$$-CH=CH-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{CH}}-(CH_2)_n$$

Cette proposition est confirmée par l'étude des produits de dégradation (voir plus loin).

Acides α-smegmamycoliques : Ces acides (F = 56-61,5°) obtenus par saponification d'α-smegmamycolates de méthyle donnent par titrage un poids moléculaire moyen de 1118 ± 50 (calculé pour $C_{79}H_{154}O_3$: 1150).

Leur analyse élémentaire est en accord avec la formule $C_{79}H_{154}O_3$.

PREPARATION DES DERIVES

Perhydro-α-smegmamycolates de méthyle : L'hydrogénation catalytique des α-smegmamycolates de méthyle en présence d'oxyde de platine donne un produit hydrogéné qui, après purification par chromatographie sur gel de silice (chromatographie II page 51), fond à 56,5-64° ; son analyse est en accord avec la formule $C_{80}H_{160}O_3$.

Le spectre I. R. de ce produit ne montre plus de bande à 975 cm^{-1}. Le spectre de R. M. N. ne présente pas de signal à 316-326 cps. Ces résultats confirment l'existence de l'insaturation dans les mycolates de méthyle de départ.

Acétyl-α-smegmamycolates de méthyle : Présence et position d'un seul hydroxyle : Nous avons vu que l'étude du spectre I. R. des α-smegmamycolates de méthyle laisse prévoir l'existence d'un hydroxyle à proximité du carboxyle. L'analyse élémentaire des acides α-smegmamycoliques et des α-smegmamycolates de méthyle est en faveur de l'existence d'un seul hydroxyle par molécule ; pour trancher de façon claire la question du nombre d'hydroxyles nous avons soumis un échantillon d'α-smegmamycolates de méthyle à l'acétylation par anhydride acétique en présence de pyridine. Les acétates formés, après chromatographie sur gel de silice (chromatographie III page 51), présentent les propriétés suivantes : F = 34-38° $[\alpha]_D = +3°$ ($CHCl_3$). Le spectre I. R. des acétates ne montre plus de bande OH, il présente une bande à 1256 cm^{-1}. L'analyse est en accord avec la formule $C_{82}H_{158}O_4$.

Ce résultat montre qu'il n'y a qu'un seul groupement acétyle par molécule.

Le spectre de R.M.N. montre un singulet à 121 cps (signal des protons du groupement CH_3 de l'acétate). La comparaison de la surface de ce singulet à celle du singulet des trois protons du groupement $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OCH_3$ confirme qu'il n'y a qu'un seul groupement acétyle par molécule de mycolate de méthyle.

La position de l'hydroxyle découle de l'étude de la "nature mycolique" des acides α-smegmamycoliques ; la chromatographie pyrolytique de leur ester méthylique donne le pic du tétracosanoate de méthyle. La spectrométrie de masse donne également le spectre du tétracosanoate de méthyle.

Les acides α-smegmamycoliques ont donc la structure partielle suivante :

$$R-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-\underset{\displaystyle C_{22}H_{45}}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

où R contient deux doubles liaisons (voir ci-dessous).

Anhydro-α-smegmamycolate de méthyle (IVb) : La déshydratation des acides α-smegmamycoliques conduit aux acides anhydro-α-smegmamycoliques IVa. L'analyse de leurs esters méthyliques, après purification par chromatographie sur acide silicique (chromatographie IV, page 59), est en accord avec la formule : $C_{80}H_{154}O_2$.

Le spectre I.R. présente une bande d'absorption à 1640 cm^{-1} attribuable à l'existence d'une double liaison conjuguée avec le C = O ester. Ceci est confirmé par le spectre UV. Ce dernier présente une bande d'absorption à 218 mμ (ε_{218} = 12300) (4, 5).

Le spectre de R.M.N. présente un *triplet* supplémentaire à 395-409 cps attribuable au proton porté par le carbone en β du carboxyle. Le fait qu'il s'agisse d'un triplet montre que le carbone en γ possède deux hydrogènes. L'absence de ramification en γ est confirmée par le spectre de R.M.N. des méromycolals (voir ci-dessous).

Méromycolals (V) : La pyrolyse d'un échantillon d'α-smegmamycolates de méthyle dans un tube à boules laisse un résidu à partir duquel nous avons isolé les α-smegma-méromycolals par chromatographie sur acide silicique (chromatographie V, page 53). Différents chercheurs, craignant sans doute l'instabilité des aldéhydes, ont conclu à l'impossibilité de l'isolement des aldéhydes méromycoliques. Pourtant nous avons isolé ces aldéhydes, à maintes reprises, au cours de ce travail (voir aussi chapitre I). La nature aldéhydique du produit que nous avons isolé après pyrolyse des α-smegmamycolates de méthyle ne fait aucun doute. L'analyse de ce produit (F = 45-50°) est en accord avec la formule : $C_{55}H_{106}O$.

Le spectre I.R. des α-smegma-méromycolals présente une bande d'absorption à 1737 cm^{-1} attribuable au groupement C = O aldéhyde et une bande à 2730 cm^{-1} attribuable à la vibration C – H de ce groupement. Il n'y a pas de bande OH sur ce spectre.

Le spectre de R.M.N. présente notamment un triplet à 582 cps attribuable au proton du groupement aldéhydique. Ici encore le fait qu'il s'agisse

d'un triplet montre que le carbone en α porte deux protons et que, par conséquent, il n'y a pas de ramification sur le carbone en γ des mycolates de départ.

α-smegma-méromycolates de méthyle (VIb) : La preuve chimique de la nature aldéhydique du produit que nous avons isolé est apportée par son oxydation en acide par l'oxyde d'argent alcalin selon Asinger (6). Les acides α-smegma-méromycoliques (VIa) ont été purifiés par chromatographie sur acide silicique (chromatographie VI, page 54). Ces acides ont les propriétés suivantes : F = 57-60°, PM = 740 (par titrage), spectre I.R. : bande à 1720 cm^{-1} ; les bandes à 1737 et 2730 cm^{-1} ont disparu ; on estérifie alors par le diazométhane et repurifie les esters par chromatographie sur gel de silice (chromatographie VII page 54). Les α-smegma-méromycolates de méthyle obtenus ont les propriétés suivantes : F = 44-47°. Le spectre I.R. de ces esters montre une bande à 1747 cm^{-1} ; la bande a 1720 cm^{-1} a disparu. Sur le spectre de R.M.N. une bande à 222 cps due aux protons du groupement méthyle ester apparaît. Le doublet à 53-59 cps du groupement méthyle secondaire $-CH=CH-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-$ est plus net sur ce spectre que sur celui des α-smegma-mycolates de méthyle puisqu'ici l'un des groupements méthyle terminaux (celui de la ramification en α des mycolates de méthyle)(*) n'existe plus.

Les résultats rapportés jusqu'à présent montrent :

a) que les acides α-smegmamycoliques sont en O_3 (un seul hydroxyle dans la molécule),

b) qu'il s'agit d'acides insaturés, le spectre de R.M.N. montrant qu'il doit y avoir plus d'une insaturation,

c) qu'il n'y a pas de ramification en γ des acides α-smegma-mycoliques,

d) qu'il y a un groupement méthyle secondaire dans la molécule.

Pour avoir plus de renseignements nous avons procédé à l'ozonolyse de différents dérivés d'acides α-smegmamycoliques : le tableau A résume la nature des fragments obtenus par ozonolyse de ces dérivés.

Tableau A

Ester soumis à l'ozonolyse :	Fragments obtenus par ozonolyse			
	a	b	c	d
IIIb	$CH_3-(CH_2)n_1-COOH$	$HOOC-(CH_2)n_2-COOH$		
VIb	$CH_3-(CH_2)n_1-COOH$	$HOOC-(CH_2)n_2-COOH$	$HOOC-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_{17}-COOH$	
IVb	$CH_3-(CH_2)n_1-COOH$	$HOOC-(CH_2)n_2-COOH$	$HOOC-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_{17}-COOH$	$C_{22}H_{45}-COOH$

Avec n_1 = 15 à 19 et n_2 = 12 à 16

(*) Le signal central du triplet des groupements méthyle terminaux se superpose à l'un des signaux des protons du groupement méthyle secondaire de type $-CH=CH-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_n$ celui qui se trouve vers les champs forts.

A - OZONOLYSE DES ANHYDRO-α-SMEGMAMYCOLATES DE METHYLE (IVb)

L'ozonolyse des anhydro-α-smegmamycolates de méthyle suivie de la destruction oxydative des ozonides par H_2O_2 (35 volumes) a fourni un mélange d'acides que nous avons traité par le diazométhane et chromatographié sur l'acide silicique (voir chromatographie VIII page 55). La chromatographie en phase vapeur des fractions éluées par le mélange éther de pétrole-benzène (70-30) montre que nous sommes en présence d'un mélange d'esters d'acides gras linéaires essentiellement à *nombre impair* d'atomes de carbone de C_{17} à C_{23} avec prédominance des acides en C_{19} et C_{23}. La structure de ces esters a été déterminée par cochromatographie avec les produits témoins d'une part et leur séparation par chromatographie préparative en phase vapeur et la spectrométrie de masse des produits recueillis d'autre part. Les fractions éluées par le mélange benzène-éther (90-10) ont été également chromatographiées en phase vapeur. Des pics ont été obtenus dont les temps de rétention (cochromatographie) sont ceux des diesters en C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19} et C_{20}, ce dernier suivi d'un pic de temps de rétention légèrement supérieur ; nous verrons qu'il s'agit de (–)-α-méthyl-eicosanedioate de méthyle ($[\alpha]_D = -15,3°$). Les plus importants de ces pics sont ceux du diester en C_{15} et de l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle. Le produit de chacun de ces pics a été séparé par chromatographie en phase gazeuse préparative. On a alors soumis chacun de ces produits à la spectrométrie de masse. L'allure générale des spectres obtenus est celle de diesters.

D'excellents travaux sur la spectrométrie de masse des diesters sont dus à Ryhage et Stenhagen (7, 8). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par ces auteurs et leurs collaborateurs. A titre d'exemple, nous rapportons ici le spectre du pentadecanedioate de méthyle, que nous avons isolé. Nous en discuterons l'attribution des pics les plus importants, ceci facilitera la compréhension du spectre du produit que nous avons identifié à l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle.

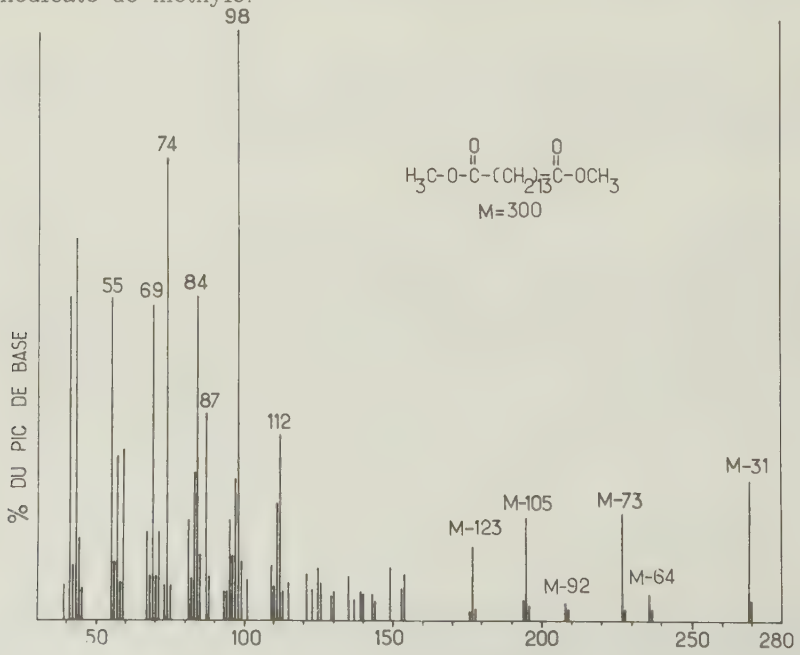
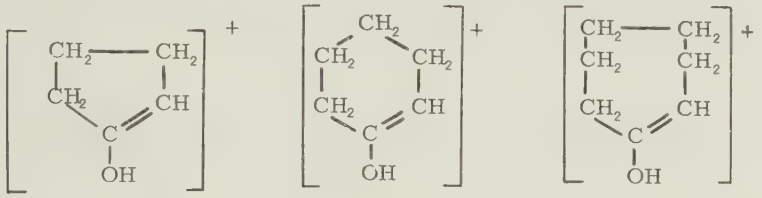


Figure 2 : Spectre de masse du pentadecanedioate de méthyle.

Sur le spectre du pentadecanedioate de méthyle (figure 2) on n'observe pas de pic moléculaire notable ; on y voit un pic à m/e = 269 soit M-31, un pic à m/e = 227 soit M-73 (clivage 2-3), un pic à m/e = 195 = M-(73 + 32) et un pic moins important à m/e = 236 soit M-2 × 32.

Des pics existent sur ce spectre à m/e = 84 + nCH_2 ; le plus important de ces pics est à m/e = 98. Les trois premiers termes seraient dûs aux ions a, b et c. (8).



(a) (b) (c)

Un pic à m/e = 74 dû au clivage 2-3 avec réarrangement d'un proton existe également

Le produit dont le temps de rétention est supérieur à celui du diester en C_{20} est d'abord soumis à la chromatographie sur couche mince ; cet examen montre qu'il n'est pas homogène mais constitué de deux produits dont un forme une petite impureté. Les deux produits sont séparés et chacun soumis à la spectrométrie de masse. L'impureté est l'eicosanedioate de méthyle. La figure 3 reproduit le spectre de masse du produit principal.

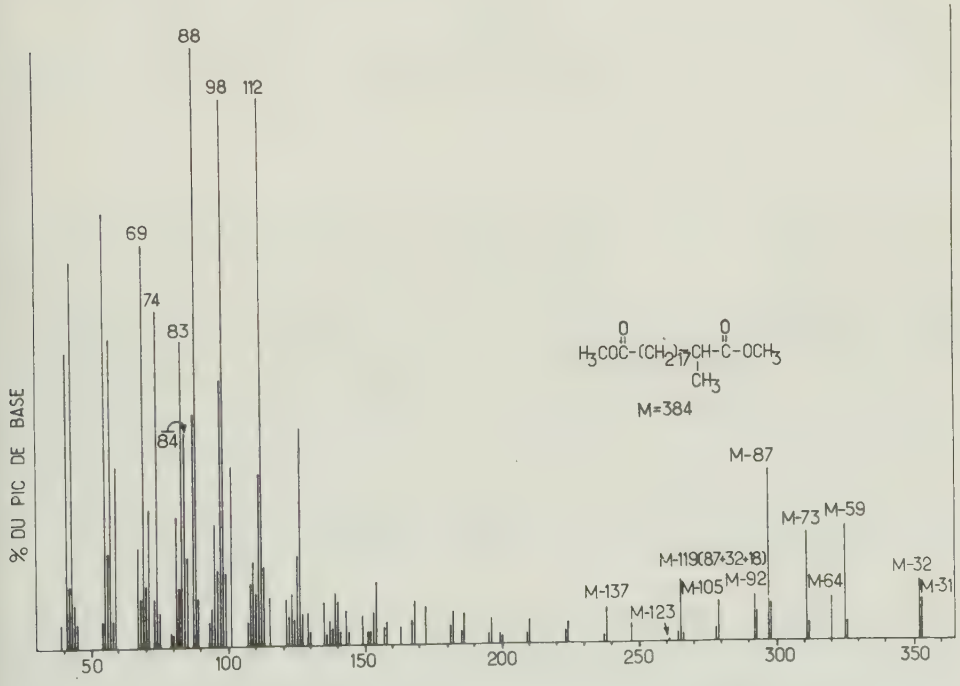
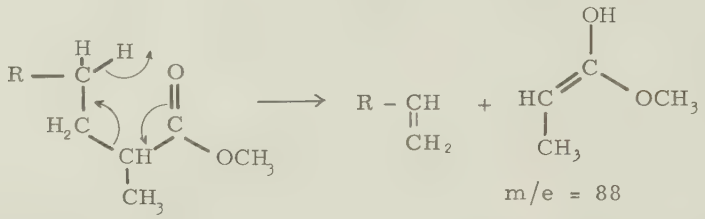
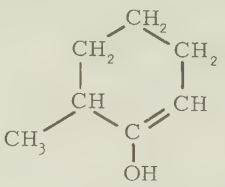


Figure 3 : Spectre de masse de l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle.

Le pic moléculaire à m/e = 384 n'est pas notable ; un pic existe à m/e = 353 (M-31), mais un pic plus important est visible à m/e = 352 (M-32). Le clivage 2-3 doit donner, d'une part un pic à m/e = M-87, on voit sur le spectre le pic à m/e = 297, et d'autre part un pic à m/e = M-73, on a le pic à m/e = 311 ; le pic à m/e = M-59 n'a pas d'importance significative sur le spectre des diesters linéaires (voir par exemple figure 2) mais ici ce pic, à m/e = 325, existe. Ceci peut s'expliquer par la coupure 1-2 au niveau d'une ramification. Cette proposition est confirmée d'ailleurs par l'existence d'un pic à m/e = 88. Ce pic de réarrangement peut s'expliquer de la manière suivante (7, 9) :



L'existence de ce pic ainsi que du pic à m/e = M-87 tend à montrer que la ramification en α est un groupement méthyle ; remarquons d'ailleurs l'importance relative des pics à m/e = 112 et à m/e = 98. Sur ce spectre et sur celui du pentadecanedioate de méthyle ; le premier de ces pics pourrait être, en partie, dû à l'ion c, d'où son importance relative. (Comparer les figures 2 et 3).



(c) : m/e = 112

En résumé donc, le comportement de ce produit au cours de la chromatographie sur colonne tendait à montrer qu'il pouvait s'agir d'un diester. Son comportement en chromatographie en phase vapeur montrait qu'il pouvait s'agir d'un diester en C_{21} ramifié. La spectrométrie de masse confirmait que ce diester était en C_{21} et qu'il portait en α une ramification méthyle.

Pour montrer davantage la nature ramifiée de cet ester nous l'avons soumis à la spectrométrie de R. M. N. (figure 4) : un doublet a été obtenu à 62-69 cps. La présence d'un doublet montre qu'il s'agit bien d'un groupement méthyle secondaire. La comparaison de la surface de ces pics à celle du singulet à 216 cps montre qu'il doit s'agir d'un diester portant une ramification méthyle. Or, le spectre de masse montre clairement qu'il s'agit d'un groupement méthyle en α d'un carboxyle. D'ailleurs la région d'absorption des protons donnant ce doublet sur le spectre de R. M. N. confirme cette proposition.

Schématiquement donc, l'ozonolyse des anhydro-α-smegmamycolates de méthyle nous a fourni un mélange de mono- et de diacides, les constituants quantitativement les plus importants étant les acides nonadécanoïque, tricosanoïque, pentadécanedioïque et α-méthyl-eicosanedioïque. Ces résultats étaient incompa-

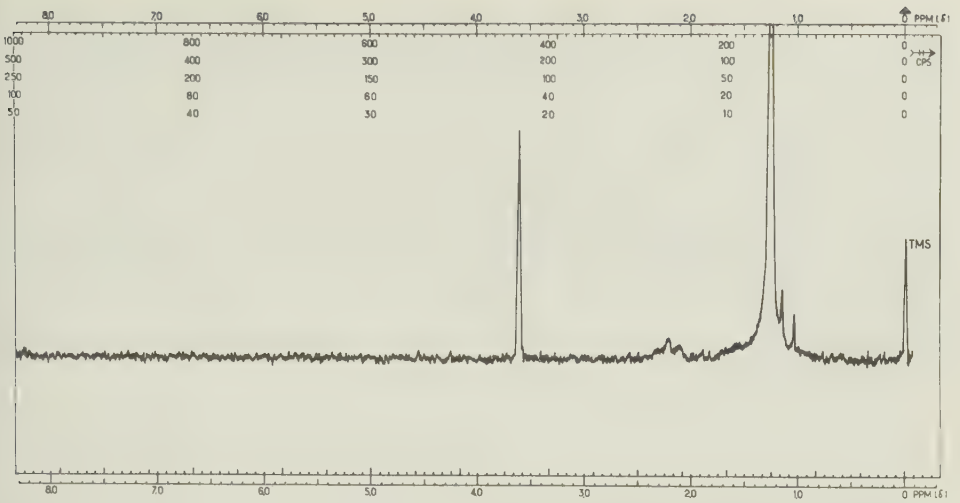


Figure 4 : Spectre de R.M.N. de l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle.

tibles avec la structure admise pour les acides mycoliques et l'hypothèse de biogénèse avancée pour eux. Il fallait donc envisager une autre structure pour ces acides et une voie de biogénèse ; mais une chose devenait également claire ; il n'y a pas un seul acide α-smegmamycolique mais plusieurs acides α-smegmamycolique. La pluralité du "fragment méromycolique" des acides mycoliques et nocardiques et même "corynomycoliques" a été depuis démontrée (voir chapitres suivants).

Mais comment établir des structures à partir des fragments obtenus ? Nous avons vu que dans les monoacides, provenant de la dégradation, l'acide nonadécanoique et l'acide tricosanoïque prédominaient. Ce dernier pouvait se former par la réaction suivante :

$$R-CH=\underset{\displaystyle C_{22}H_{45}}{\overset{\displaystyle |}{C}}-COOH \xrightarrow{O_3} \left[O=\underset{\displaystyle C_{22}H_{45}}{\overset{\displaystyle |}{C}}-COOH\right] \longrightarrow \underset{\displaystyle C_{22}H_{45}}{\overset{\displaystyle |}{C}}OOH$$

(a)

On sait (10) et Asselineau l'a vérifié par ozonolyse de différents acides anhydro-mycoliques qu'au lieu du cétoacide (a), l'acide avec un carbone de moins peut être obtenu (11)(*).

Pour vérifier de façon univoque l'origine de l'acide tricosanoïque, nous avons fait l'expérience suivante :

B - OZONOLYSE D'α-SMEGMA-MEROMYCOLATES DE METHYLE ET D'α-SMEGMA-MEROMYCOLALS

Les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment. Après la destruction oxydative des ozonides et traitement des acides obtenus par le

---

(*) Pour le mécanisme de l'ozonolyse des acides α-β-insaturés voir (10).

diazométhane, on chromatographie les esters sur le gel de silice. Dans la partie expérimentale nous rapportons une chromatographie effectuée sur les produits obtenus après ozonolyse d'α-smegma-méromycolals (voir chromatographie IX page 56). Sur le chromatogramme en phase vapeur des monoesters on retrouve les pics des esters d'acides gras de C_{17} à C_{21} avec prédominance nette de celui de nonadécanoate de méthyle. Le pic de tricosanoate de méthyle manque, ce qui confirme l'origine qui lui a été attribuée. Sur le chromatogramme des diesters tous les produits mentionnés ci-dessus, produits d'ozonolyse d'anhydro-mycolates de méhtyle, se retrouvent. Ces résultats d'ozonolyse montrent clairement qu'il doit y avoir deux doubles liaisons dans les molécules ; on ne peut expliquer autrement le faible poids moléculaire des fragments obtenus : pour fixer la place de la double liaison proche du groupement carboxylique des acides α-smegmamycoliques, nous avons fait l'expérience suivante :

C - OZONOLYSE DES ACETYL-α-SMEGMAMYCOLATES DE METHYLE

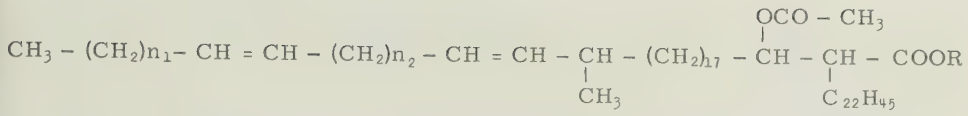
La marche des opérations est la même que lors de l'ozonolyse des anhydro-α-smegmamycolates de méthyle. Après destruction oxydative des ozonides on traite le mélange d'acides par le diazométhane et on chromatographie sur gel de silice en vue de séparer les mono et les diesters (voir chromatographie X page 57) : l'allure du chromatogramme en phase vapeur des mono esters est la même que précédemment, à cette différence près qu'on n'observe pas de pic du tricosanoate de méthyle. La fraction de "diester" est distillée dans un tube à boules et les fractions distillant jusqu'à 270° sous 0,01 mmHg sont chromatographiées en phase vapeur. Tous les diesters mentionnés précédemment sont présents jusqu'à l'octadecanedioate de méthyle inclus. L'absence de diester en C_{19} mais surtout celle de l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle est remarquée. Le résidu de la distillation est chromatographié en phase vapeur ; aucun pic n'est obtenu.

Si on tient compte du fait qu'il n'y a pas de ramification en γ des acides α-smegmamycoliques on peut écrire la structure (IIIb) pour les acétyl-α-smegmamycolates de méthyle, et les structures des acides α-smegmamycoliques (IIa) et α-smegma-méromycoliques (IVa) en découlent naturellement. En considérant les fragments importants des ozonolyses on peut proposer la structure VII pour un acide α-mycolique dominant qui correspond à la formule $C_{79}H_{154}O_3$. Par ailleurs, l'absence du nonadecanedioate de méthyle dans les produits d'ozonolyse des acétyl-α-smegmamycolates de méthyle semble montrer qu'il doit y avoir, en très faible proportion, des représentants non ramifiés dans le mélange d'acides α-smegmamycoliques.

$$CH_3-(CH_2)n_1-CH=CH-(CH_2)n_2-CH=CH-\underset{\underset{CH_3}{|}}{CH}-(CH_2)_{17}-\overset{\overset{OH}{|}}{CH}-\underset{\underset{C_{22}H_{45}}{|}}{CH}-COOR$$

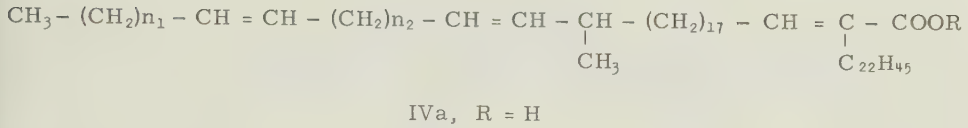
n_1 = 15 à 19 IIa R = H

n_2 = 12 à 16 IIb R = CH_3



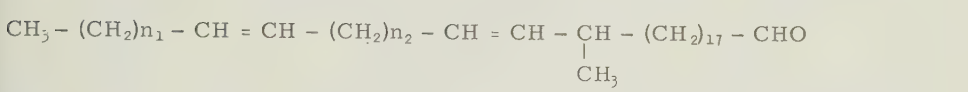
IIIa, R = H

IIIb, R = CH_3

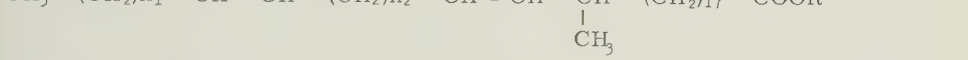


IVa, R = H

IVb, R = CH_3

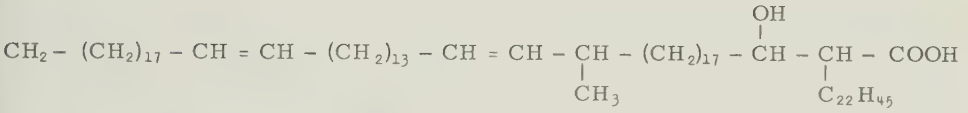


V



VIa, R = H

VIb, R = CH_3

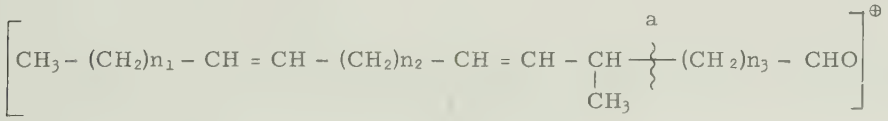


VII

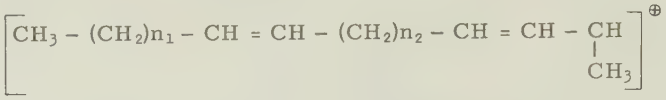
Confirmation, par la spectrométrie de masse, des structures proposées :

Les mycolates de méthyle ainsi que les méromycolates ont été soumis à la spectrométrie de masse. Les résultats obtenus confirment ceux déjà mentionnés : sur le spectre des mycolates de méthyle on observe une série de pics à m/e = 1104, 1118, 1132, 1146 et 1160 (figure 7a, chapitre II). Des pics d'homologues inférieurs et supérieurs existent également, mais sont de faibles intensités ; il s'agit des pics moléculaires d'anhydromycolates de méthyle : $C_{77}H_{148}O_2$, $C_{78}H_{150}O_2$, $C_{79}H_{152}O_2$, $C_{80}H_{154}O_2$, $C_{81}H_{156}O_2$. La série de pics à m/e = 712-824 (figure 7b, chapitre II) est attribuable aux pics moléculaires d'aldéhydes α-smegma-méromycoliques de formules brutes $C_{50}H_{96}O$, $C_{51}H_{98}O$, $C_{52}H_{100}O$, $C_{53}H_{102}O$, $C_{54}H_{104}O$, $C_{55}H_{106}O$, $C_{56}H_{108}O$, $C_{57}H_{110}O$, $C_{58}H_{112}O$. La série de pics à m/e = 473-474 à 571-572 (figure 7c, chapitre II) peut correspondre à des coupures et réarrangements schématisés ci-dessous.

Prenons la structure générale d'un α-smegma-méromycolal

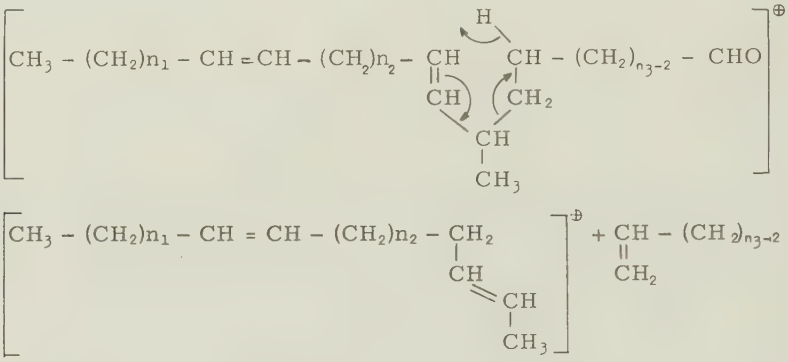


La coupure selon a est possible étant donné qu'elle s'opère au niveau d'une ramification d'une part et en position allylique par rapport à une double liaison d'autre part, or, si nous posons $n_1 = 17$ et $n_2 = 13$ nous pouvons calculer une masse de 543 pour l'ion (a).



ion (a) : m/e = 543

Prenons maintenant la structure de la même aldéhyde et tenons compte du réarrangement schématisé :



ion (b) : m/e = 544

Posons maintenant $n_1 = 17$ et $n_2 = 13$ on aura une masse de 544 pour l'ion (b). Or, justement, les pics à m/e = 543 et 544 existent sur le spectre (figure 7c, chapitre II). Par des raisonnements semblables on peut expliquer la série de doubles pics que nous avons mentionnée. Il va de soi que cette explication n'est valable que si les pics correspondent réellement à des hydrocarbures, or les mesures de masse effectuées montrent qu'il en est bien ainsi(*).

Sur le spectre de méromycolates de méthyle (figure 7d, chapitre II) on observe des pics à m/e = 742-854. Il s'agit de pics moléculaires de ces esters. Sur le spectre on retrouve les pics de coupure et de réarrangement (ions a et b) que nous avons mentionnés à propos du spectre des α-smegmamycolates de méthyle.

En conclusion, il nous semble plausible de proposer la structure IIa pour les acides α-smegmamycoliques. Les représentants les plus abondants ont les formules brutes $C_{76}H_{148}O_3$ à $C_{80}H_{156}O_3$.

(*) Nous remercions le Dr. M. Barber d'avoir bien voulu effectuer ces mesures.

PARTIE EXPERIMENTALE

Le tableau I donne le pourcentage des cires obtenues par le traitement de l'extrait chloroformique de *M. smegmatis* par la technique de séparation d'Anderson (12) modifiée par Asselineau et Lederer (13).

Tableau I

cires	B	C	D
%	10	80	10

SAPONIFICATION D'UN MELANGE DE CIRES C ET D

24 g d'un mélange de cires C et D sont saponifiés en présence de 200 ml de KOH méthanolique à 5 % pendant 6 heures de chauffage au reflux. On évapore les solvants, on acidifie avec une solution de SO_4H_2 et on isole l'éthérosoluble. Cet éthérosoluble susceptible de contenir l'insaponifiable, les "acides inférieurs" et les "acides mycoliques" est ensuite épuisé trois fois par du méthanol bouillant en utilisant pour chaque épuisement 10 fois (en volume) la quantité du mélange (en poids) de méthanol. On obtient ainsi 12 g "d'acides mycoliques bruts". Une chromatographie sur plaque de ces "acides mycoliques" montre qu'ils contiennent des mycolates de méthyle.

Cette expérience montre que la fraction qu'on isole par le traitement classique (isolement d'une fraction "insaponifiable") outre qu'elle peut contenir les sels d'acides, elle peut également contenir des esters méthyliques, ces derniers étant formés par transestérification (voir aussi 11).

Quoi qu'il en soit, après traitement de ces "acides mycoliques" par le diazométhane, la chromatographie sur plaque montre que le mélange ne contient principalement que les acides mycoliques ; de faibles quantités d'acides banaux et d'acides méromycoliques sont également présentes (voir figure 1 page 36). Les 12 g du mélange de mycolates de méthyle bruts sont chromatographiés sur une colonne de 360 g de gel de silice (voir chromatographie I).

On voit qu'à partir de l'éluat n° 46 une fraction importante est éluée.

La chromatographie sur plaque montre que les fractions 47 à 62 sont formées d'α-smegmamycolates de méthyle.

Les fractions 104 et 106 constituent les β-smegmamycolates de méthyle. On peut noter que ces derniers se séparent nettement des fractions précédentes alors qu'il n'y a pas une séparation nette entre les fractions d'α-smegmamycolates de méthyle et les fractions suivantes qui contiennent des esters que nous appelons les α'-smegmamycolates de méthyle : il ne s'agit pas ici d'un "accident" de la chromatographie ; la chromatographie sur plaque montre que si les fractions 76 et suivantes jusqu'à la fraction 94 ne sont pas pures elles donnent constamment une tache importante dont le Rf correspond à celui d'α'-smegmamycolates de méthyle (voir figure 1 page 36), distincte de celle d'α-smegmamycolates de méthyle et de β-smegmamycolates de méthyle. On peut estimer à environ 60 % le pourcentage d'α-smegmamycolates de méthyle, 25 % celui de l'α'-smegmamycolates de méthyle et

Chromatographie I

Fraction	Nature de l'éluant	Volume de l'éluant	Quantité en mg de produit
1 à 4	Ether de pétrole	360	0
5 et 6	Ether de pétrole-Benzène 90:10	180	0
7 et 8	" " " " 85:15	"	16
9 à 16	" " " " 80:20 à 70:30	720	0
17 et 18	" " " " 65:35	180	42
19 et 20	" " " " " "	"	0
21	" " " " 60:40	90	17
22 à 24	" " " " " "	270	70
25	" " " " 55:45	90	5
26 et 28	" " " " " "	270	284
29 à 31	" " " " " "	"	237
32 à 34	" " " " " "	"	289
35 à 37	" " " " " "	"	190
38 à 40	" " " " 45:55	"	94
41 à 43	" " " " 40:60	"	88
44 et 45	" " " " " "	180	42
46	" " " " " "	90	228
47-49	" " " " " "	270	1382
50-52	" " " " " "	"	1167
53-55	" " " " " "	"	933
56-58	" " " " " "	"	813
59-61	" " " " 40:60	270	686
62-84	" " " " " "	"	548
65-67	" " " " " "	"	364
68-70	" " " " " "	"	311
71-73	" " " " " "	"	264
74 et 75	" " " " " "	180	233
76-78	" " " " 30:70	270	411
79-81	" " " " 20:80	"	529
82-84	" " " " " "	"	447
85-87	" " " " " "	"	367
88-90	" " " " 15:85	"	211
91-93	" " " " 10:90	"	121
94-96	Benzène	"	55
97-99	Benzène-éther 95:5	"	6
100-102	" " 90:10 à 85:15	"	29
103-105	" " 80:20	"	922
106-108	" " " "	"	271
109-111	" " 70:30	"	28
112-114	" " 50:50	"	19
115-117	" " 40:60	"	14
118-120	Ether	"	16
121-123	Ether ac. acétique 95:5	"	27
124-126	" " " 90:10	"	10
		Total :	11.766 mg

15 % celui des β-smegmamycolates de méthyle. La chromatographie sur plaque de la fraction 46 donne nettement deux taches distinctes approximativement de même importance ; le Rf de l'une correspond à celui des α-smegmamycolates de méthyle, l'autre a un Rf plus important ; nous appelons les esters correspondants les pré-α-smegmamycolates de méthyle (voir figure 1 page 36).

ETUDE DES ACIDES α-SMEGMAMYCOLIQUES

Les fractions 47 à 62 donnent une seule tache à la chromatographie sur couche mince. Le point de fusion mesuré pour plusieurs de ces fractions est de 47-51°. Pourtant ces fractions ne présentent pas toutes le même pouvoir rotatoire : le tableau I donne les valeurs obtenues pour quelques fractions :

Tableau I

Pouvoir rotatoire de certaines fractions de la chromatographie I

Fraction	47		48	51	53	55	57	59	61	Mélange 47-52
C	8,4	12	7,1	8,6	11	7,9	11,3	5,9	9,2	10
$[\alpha]_D$	+1,65° ±0,15°	+1,45° ±0,15°	+1,20° ±0,15°	+1,4° ±0,15°	+1,8° ±0,1°	+2,1° ±0,15°	+2,1° ±0,1°	+2,5° ±0,15°	+2,4° ±0,1°	+1,40° ±0,1°

On constate une augmentation des valeurs au fur et à mesure que le pouvoir rotatoire des fractions les plus retenues sur la colonne est déterminé.

Les fractions 47 à 52 sont mélangées ; ce mélange a comme pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +1,4°$.

Les différentes mesures ont été effectuées en utilisant le chloroforme comme solvant et à l'aide d'un polarimètre électronique "Quick Polarimètre Roussel-Jouan".

C'est le mélange des fractions 47 à 52 qui nous a servi pour la plupart des réactions de détermination de structure.

Son analyse élémentaire est en accord avec la formule $C_{80}H_{156}O_3$:

Calc. %	C 82,47	H 13,40	O 4,12	OCH_3 2,66
tr.	82,44	13,57	4,24	2,60

I.R. : cellule 1 mm, solution 0,03 M/l, solvant CCl_4 : bandes C = O : 1727 et 1742 ; OH : 3537, 3577 et 3623.

en solution dans CS_2 : on observe en outre une bande à 975 cm^{-1}

Spectre de R.M.N. : triplet à 316-326 cps

Acides α-smegmamycoliques : 1,960 g d'α-smegmamycolates de méthyle sont saponifiés par chauffage au reflux avec 24 ml de KOH méthanolique à 5 %, en présence de 12 ml de benzène, pendant trois heures. On évapore les solvants et on extrait par traitement habituel 1,753 g d'acides α-smegmamycoliques et 112 mg de "neutre".

L'analyse de l'acide est en accord avec la formule $C_{79}H_{154}O_3$:

Calc. %	C 82,43	H 13,39
tr.	82,28	13,20

Microtitrage des acides α-smegmamycoliques : Il s'effectue sur 2 à 4 mg d'acide en utilisant l'acide tétracosanoïque synthétique comme témoin.

Une microburette Prolabo est utilisée pour la manipulation de la solution environ N/100 de KOH dans l'alcool éthylique.

Les acides à titrer et l'acide témoin sont dissous dans un ml de $CHCl_3$ dont on mesure auparavant l'acidité. Le bleu de bromothymol est utilisé comme indicateur.

La formule suivante donne le poids moléculaire de l'acide inconnu :

$$PM_i = \frac{a_i}{a_c} \cdot \frac{b_c}{b_i} \cdot PM_c$$

a_i = poids en mg de l'acide inconnu

a_c = poids en mg de l'acide connu

b_i = divisions de microburette d'une solution de KOH (environ N/100) nécessaire pour neutraliser a_i

b_c = divisions de microburette de la même solution de KOH nécessaire pour neutraliser a_c

PM_c = poids moléculaire de l'acide connu utilisé comme témoin

Le poids moléculaire trouvé par cette technique pour les acides α-smegmamycoliques est de 1118 ± 50.

Hydrogénation catalytique : On soumet 400 mg d'α-smegmamycolate de méthyle à l'hydrogénation catalytique en présence de 50 mg d'oxyde de platine. La réaction se fait à 37° le produit étant dissous dans 17 ml d'acétate d'éthyle. On agite fortement à l'aide d'un agitateur magnétique. Quand l'absorption d'hydrogène est terminée on arrête la réaction. Le produit de la réaction ainsi que les α-smegmamycolates de méthyle eux-même ne sont pas solubles dans l'acétate d'éthyle à froid. On filtre sur verre fritté et on lave abondamment avec le chloroforme. Le filtrat, 341 mg, est chromatographié sur 10 g d'acide silicique. Le produit n'étant pas soluble dans l'éther de pétrole on commence la chromatographie par le tétrachlorure de carbone (voir chromatographie II). On utilise 20 ml d'éluant pour chaque élution.

Les fractions 3 à 7 sont réunies et recristallisées deux fois dans l'acétate d'éthyle : F = 56,5-64°. L'analyse élémentaire est en accord avec la formule $C_{80}H_{160}O_3$.

Calc :	C 82,18	H 13,68
tr.	82,08	13,78

I. R. : effectué dans le CS_2 : pas de bande à 975 cm^{-1} ; Spectre de R. M. N. : pas de proton oléfinique.

Chromatographie II

Fraction	Nature de l'éluant		Quantité en mg de produit
1	CCl_4		traces
2	CCl_4 - Benzène	90:10	5
3	" "	80:20	41
4	" "	" "	87
5	" "	" "	58
6	" "	" "	33
7	" "	" "	28
8	" "	70:30	13
9	" "	50:50	26
10	Benzène pur		15
11	Benzène-Ether	50:50	9
12	Ether		6
13	Ether-ac. acétique	98:2	5
			Total : 326 mg

Acétyl-α-semegmamycolates de méthyle : 1,5 g d'α-smegmamycolates de méthyle ont été dissous dans 12 ml de pyridine sèche ; on y ajoute un mélange de 4,4 ml d'anhydride acétique et 6 ml de pyridine. On abandonne la solution pendant une nuit à 37°C. On détruit l'excès d'anhydride acétique par l'eau en maintenant le mélange à froid ; on extrait ensuite à l'éther. L'extrait éthéré est lavé à l'acide chlorhydrique dilué puis par une solution de CO_3H Na. On lave à l'eau jusqu'à neutralité et on obtient 1,52 g de produit que l'on chromatographie sur 45 g de gel de silice (voir chromatographie III).

Chromatographie III

Fraction		Volume de l'éluant	Quantité de produit en mg
1	Ether de pétrole	90	0
2 à 9	Ether de pétrole-Benzène 95:5 à 70:30	400	0
10	" " " " 70:30	50	traces
11	" " " " " "	"	105
12 à 14	" " " " " "	90	384
15 à 18	" " " " 65:35	120	355
19-22	" " " " " "	"	265
23-27	" " " " 60:40	"	156
27-30	" " " " 55:45	200	163
31-33	" " " " 55:45 à 40:60	230	30
34	Benzène pur	90	10
			total : 1.468 mg

Les différentes fractions ont été examinées par chromatographie sur couche mince ; les fractions 12 à 30 (1334 mg) donnent une seule tache ; leur mélange fournit également une seule tache. On les réunit : F = 34-38°.

$[\alpha]_D$ = + 3° (chloroforme, C = 9,2), spectre I.R. : bande à 1256 cm^{-1}, UV : pas d'absorption ; R.M.N. : signal notamment à 121 cps ; Analyse $C_{82}H_{158}O_4$:

Calc. % :	C 81,59	H 13,07	O 5,29
tr.	81,43	13,00	5,42

Préparation des anhydro-α-smegmamycolates de méthyle : 995 mg d'acides α-smegmamycoliques ont été chauffés au reflux pendant six heures en présence de 100 ml d'anhydride acétique et 7 g de sulfate acide de potassium fraichement fondu et pulvérisé. On décompose l'anhydride acétique par l'eau en maintenant le ballon de la réaction au froid et on extrait à l'éther. 937 mg de produit ont été obtenus. On saponifie en chauffant pendant 2 heures en présence de 12 ml de KOH méthanolique à 5 % contenant 5 ml de benzène. On acidifie et on extrait l'éthérosoluble par le traitement habituel. Les acides obtenus sont traités avec le diazométhane et les anhydro-α-smegmamycolates de méthyle bruts obtenus, 886 mg, sont chromatographiés sur 27 g d'acide silicique ; l'élution se fait avec 80 ml d'éluant pour chaque élution (voir chromatographie IV).

Chromatographie IV

Fraction	Nature de l'éluant	Quantité de produit élué en mg
1	Ether de pétrole	19
2	" " "	traces
3	Ether de pétrole-Benzène 95:5	52
4	" " " " 90:10	396
5	" " " " " "	90
6	" " " " " "	5
7	" " " " 85:15	1
8	" " " " 80:20	9
9	" " " " 70:30	traces
10	" " " " 60:40	12
11	Benzène	198
12	"	20
13	Benzène-Ether 90:10	14
14	" 50:50	10
15	Ether	28
16	"	traces
17	Ether-méthanol 90:10	"
18	Ether-ac. acétique 95:5	"
		Total : 854 mg

L'étude porte sur la fraction 4 de cette chromatographie :

F = 34-35° $[\alpha]_D$ = - 1,7° (solvant utilisé $CHCl_3$, C = 10). Analyse : $C_{80}H_{154}O_2$

Calc.	C 83,40	H 13,47
tr.	83,76	13,45

I.R. : bande notamment 1640 cm^{-1}. U.V. : bande à 218 mμ (ε_{218} = 12320), Spectre de R.M.N. : notamment triplet à 395-409 cps.

Aldéhydes α-smegma-méromycoliques : 307 mg d'α-smegmamycolates de méthyle sont chauffés dans un tube à boules sous 0,01 mmHg. On recueille :

- une fraction distillant jusqu'à 270° : 94 mg
- une petite fraction intermédiaire qui distille quand on prolonge le chauffage : 10 mg
- et un résidu de 204 mg

Ce résidu est chromatographié sur 6 g de gel de silice en utilisant 6 ml d'éluant pour chaque fraction (voir chromatographie V).

Chromatographie V

Fraction	Nature de l'éluant	Quantité en mg de produit
1	Ether de pétrole	7
2	" " "	traces
3	Ether de pétrole-benzène 90:10	19
4	" " " " 85:15	112
5	" " " " " "	38
6	" " " " " "	4
7	" " " " 75:25	0
8	" " " " 50:50	traces
9	Benzène	16
10	Benzène-éther 90:10	4
11	Ether	0
12	Ether-ac. acétique 95:5	0
		Total : 200 mg

Les fractions 3, 4 et 5 de cette chromatographie sont réunies : F = 45-50° I.R. : bandes à 1737 cm^{-1} et 2730 cm^{-1}. Spectre de R.M.N. : notamment triplet à 582 cps, Analyse : $C_{55}H_{106}O$

Calc. % :	C 84,39	H 13,55
tr.	84,26 et 84,07	13,44 et 13,40

Acides α-smegma-méromycoliques : On prépare une suspension fraîche de Ag_2O comme suit : à 4 ml d'une solution de NaOH à 10 % on ajoute 3 g de NO_3Ag. On amène à 90° et on agite pendant 1/4 d'heure le mélange ; on introduit alors en faibles portions une solution éthérée de 150 mg d'aldéhydes α-smegma-méromycoliques de façon à ce que l'éther s'évapore au fur et à mesure ; on maintient une forte agitation après la fin de l'introduction ; on continue le chauffage (à 90°) et l'agitation pendant 3 heures. On ajoute alors de l'eau, de l'éther, de l'acide nitrique dilué et après une forte agitation on filtre ; la phase éthérée est lavée à l'eau et après le traitement habituel on obtient 138 mg d'acides α-smegma-méromycoliques bruts, peu solubles dans l'éther de pétrole. On chromatographie sur 4 g de gel de silice, en commençant par le tétrachlorure de carbone. 12 ml d'éluant sont utilisés pour chaque élution (voir chromatographie VI).

Chromatographie VI

Fraction	Nature de l'éluant		Quantité en mg de produit	F°
1	CCl_4		19	43-44°
2	"		9	
3	"		5	49-56°
4	CCl_4-Benzène	95:5	17	56-59°
5	" "	90:10	22	57-60°
6	" "	90:15	16	
7	" "	80:20	13	57-60°
8	" "	75-25	8	57-60°
9	" "	70-30	5	
10	" "	65-35	3	
11	" "	60:40	2	
12	" "	20:80	1	
13	Benzène		2	
14	Benzène-éther	50:50	5	
15	Ether		0	
16	Ether-ac. acétique	95:5	0	
			Total : 127 mg	

Les premières fractions contiennent encore les aldéhydes n'ayant pas réagi. Les fractions 5 à 9 sont réunies et titrées. On trouve 742 comme poids moléculaire. Il s'agit d'acides α-smegma-méromycoliques F = 57-60°.

α-smegma-méromycolates de méthyle : Le reste d'acides α-méromycoliques, 53 mg, est traité d'abord par le diazométhane puis chromatographié sur 1 g de gel de silice. Volume de chaque élution 1 ml (voir chromatographie VII).

Chromatographie VII

Fraction	Nature de l'éluant		Quantité de produit en mg
1	Ether de pétrole		0
2	Ether de pétrole-benzène	95:5	0
3	" " " "	85:15	0
4	" " " "	70:30	41
5	" " " "	" "	11
6	" " " "	" "	0
7	Benzène		1
8	Ether		0
9	Ether-ac. acétique		0
			Total : 53 mg

Les fractions 4 et 5 ont été réunies : F = 44-47°, spectre I.R. : bande à 1747 cm^{-1}, spectre de R.M.N. : notamment bande à 222 cps (signal des protons du groupement méthyl-ester). Spectre de masse : pics moléculaires à m/e = 742, 756, 770, 784, 798, 812, 826, 840 et 854.

OZONOLYSE DES DERIVES D'ACIDES α-SMEGMAMYCOLIQUES

A - Ozonolyse des anhydro-α-smegmamycolates de méthyle :

299 mg d'anhydro-α-smegmamycolates de méthyle sont dissous dans 12 ml de CCl_4. On soumet la solution à un courant d'ozone pendant 5 heures. On évapore le solvant à froid et on dissout l'ozonide dans le minium d'éther. On introduit la solution éthérée par petites portions dans un ballon contenant 10 ml de H_2O_2(35 volumes) sous agitation. On chauffe alors au reflux pendant 4 heures, après quoi on sépare une fraction acide, 237 mg, et une fraction "neutre", 83 mg. 190 mg de la fraction acide après traitement par le diazométhane sont chromatographiés sur 6 g de gel de silice. Volume d'éluant pour chaque fraction = 18 ml (voir chromatographie VIII).

Chromatographie VIII

Fraction	Nature de l'éluant	Quantité en mg de produit
1	Ether de pétrole	0
2	Ether de pétrole-Benzène 95:5	1
3	" " " " 90:10	3
4	" " " " 80:20	0
5	" " " " 75:25	6
6	" " " " 70:30	16
7	" " " " 65:35	6
8	" " " " 60:40	2
9	" " " " 50:50	1
10	" " " " 20:80	5
11	Benzène pur	7
12	Benzène-éther 90:10	40
13	" " " "	76
14	" " " "	6
15	" " " "	4
16	" " 50:50	11
17	Ether	6
18	Ether-ac. acétique 95:5	1
		Total : 191 mg

La chromatographie en phase vapeur de la fraction 6 donne des pics de monoesters en C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20}, C_{21} et C_{23}. Les pics des esters d'acides à nombre impair d'atomes de carbone dominent ; les deux pics les plus importants sont ceux des esters d'acides en C_{19} et C_{23}.

La chromatographie du mélange des fractions 12 et 13 donne les pics de diesters d'acides dicarboxyliques en C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20} et C_{21} ramifié. Les pics les plus importants sont ceux du pentadecanedioate de méthyle et d'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle ; outre les pics mentionnés, un pic de faible importance existe également entre ceux de l'heptadecanedioate de méthyle et de l'octadecanedioate de méthyle. Au cours de différentes expériences d'ozonolyse, effectuées afin d'obtenir assez de produit pour déterminer la nature des composés qui donnent ces nombreux pics, nous avons constaté que d'autres pics pouvaient apparaître, de façon inconstante, sur les chromatogrammes. Nous avons étudié les produits des pics les plus importants et les plus constants.

La chromatographie en phase vapeur est effectuée sur une colonne de silicone DC 550 à 5 % sur chromosorb, de 2,5 m de long et de 4 mm de diamètre intérieur. Le gaz vecteur est l'hélium, avec un débit de 4,5 l/h. L'appareil utilisé est le F et M muni d'un catharomètre. Cet appareil permet la programmation de la température. Dans les études analytiques nous avons en général commencé la chromatographie à 160° et utilisé un programme de 2,9°/mn ; dans les études préparatives où des quantités de 2 à 4 mg ont été injectées, un programme de 1,5° a été utilisé.

B - Ozonolyse des α-segma-méromycolals :

1020 mg de méromycolals obtenus comme décrit précédemment sont mis en solution dans 30 ml de CCl_4. On fait passer un courant d'ozone pendant 4 heures ; on isole les ozonides que l'on oxyde par Ag_2O alcalin : NaOH 10 % 20 cc, NO_3Ag 12 g. Après 3 heures de chauffage au reflux on traite le mélange avec NO_3H et on extrait l'éthérosoluble par traitement habituel. On obtient 1068 mg de produit que l'on traite par le diazométhane et que l'on chromatographie sur 30 g d'acide silicique (voir chromatographie IX).

Chromatographie IX

Fraction	Nature de l'éluant	Quantité en mg de produit
1	Ether de pétrole	0
2	Ether de pétrole-benzène	0
3	" " " " 85:15	0
4	" " " " 80:20	traces
5	" " " " 75:25	"
6	" " " " 70:30	12
7	" " " " 60:40	84
8	" " " " 55:45	54
9	Ether de pétrole-benzène 55:45	23
10	" " " " 50:50	12
11	" " " " 40:60	traces
12	" " " " 25:75	12
13	" " " " 20:80	20
14	Benzène	38
15	Benzène-éther 95:5	72
16	" " 90:10	208
17	" " 75:25	221
18	" " " "	80
19	" " " "	30
20	" " " "	14
21	" " 50:50	1
22	Ether-ac. acétique 95:5	11
		Total : 892 mg

Les fractions 6, 7, 8, 9 et 10 sont chromatographiées en phase vapeur sur une colonne de silicone à 5 % : on trouve les pics de monoesters de C_{17} à C_{21}. Le pic dominant est celui du nonadecanoate de méthyle. Le pic du tricosanoate est absent.

La chromatographie en phase vapeur des fractions 14, 15, 16, 17 et 18 effectuée dans les mêmes conditions que pour les fractions de la chromatographie des produits d'ozonolyse des anhydro-α-smegmamycolates de méthyle donne les pics des mêmes diesters en C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20} et d'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle.

C - Ozonolyse des acétyl-α-smegmamycolates de méthyle :

1,24 g d'acetyl-α-smegmamycolates de méthyle sont dissous dans 30 ml de CCl_4 et soumis à un courant d'ozone pendant 4 heures. On évapore la presque totalité du solvant ; l'ozonide, dissous dans l'éther, est introduit en petites portions dans un ballon de 100 ml contenant 35 ml d'eau oxygénée (35 V) en agitant fortement. Puis on chauffe au reflux, tout en maintenant l'agitation, pendant 4 heures. Par le traitement habituel on sépare l'éthérosoluble que l'on traite par le diazométhane. On obtient ainsi 1,319 g de produit que l'on chromatographie sur 35 g d'acide silicique (voir chromatographie X).

Chromatographie X

Fraction	Nature de l'éluant	Quantité de produit en mg.
1	Ether de pétrole-benzène 90:10	0
2	" " " " 80:20 à 70:30	3
3	" " " " 60:40	85
4	" " " " 40:60	75
5	" " " " 30:70 et 20:80	31
6	" " " " 10:90	30
7	Benzène	59
8	"	84
9	"	81
10	"	42
11	Benzène-éther 95:5	205
12	" " 90:10	528
13	" " 85:15	44
14	" " " "	7
15	Ether	25
16	Ether-ac. acétique 95:5	9
		Total : 1.308 mg

Le mélange des fractions 3 et 4 est chromatographié en phase vapeur, dans les conditions déjà décrites, les pics des monesters sont obtenus où domine celui du nonadecanoate de méthyle.

Etude des fractions 11 et 12 : 99 mg de la fraction 11 sont distillés dans un tube à boules ; on sépare trois fractions :

Fraction	Quantité en mg	t° de distillation
I	25	130-220
II	37	220-270
III	32	résidu

La chromatographie en phase vapeur des fractions I et II et la cochromatographie avec des diesters synthétiques montre que ces fractions contiennent des diesters en C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17} et C_{18}. Le pic du pentadecanedioate de méthyle est dominant ; le résidu est chromatographié en phase vapeur, aucun pic n'est obtenu.

Le traitement de la fraction 12 donne des résultats semblables.

BIBLIOGRAPHIE

(1) M. BARBIER et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta 14, 246 (1954).

(2) R. CLERMONTE et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci. 242, 2600 (1956).

(3) G. LANEELLE - C.R. Acad. Sci., 257, 781 (1963).

(4) L. AHLQUIST, C. ASSELINEAU, J. ASSELINEAU, S. STÄLLBERG-STENHAGEN et E. STENHAGEN - Arkiv. Kemi, 13, 543 (1959).

(5) H.H. JAFFE et MILTON ORCHIM - Theory and applications of ultraviolet spectrometry. John Wiely and Sons, Inc. New York. P. 212 (1964).

(6) F. ASINGER - Ber., 75, 656 (1942).

(7) R. RYHAGE et E. STENHAGEN - In F.W. McLafferty, Mass spectrometry of Organic ions, Academic Press, New York and London, 1963, P. 444.

(8) R. RYHAGE et E. STENHAGEN - Aikiv. Kemi 23. 167 (1964).

(9) F.W. McLafferty - Anal. Chem. 131, 82 (1959).

(10) P.S. BAILEY - Chem. Review, 58, 926 (1956).

(11) J. ASSELINEAU - Thèse de doctorat d'Etat, Paris 1950. Ed. Arnette 1951.

(12) R.J. ANDERSON - Fortschr. Chem. Org. Naturst., 3, 145 (1939).

(13) A. AEBI, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Bull Soc. Chim. Biol., 35, 661 (1953).

CHAPITRE IV

SUR LA STRUCTURE DES ACIDES α-MYCOLIQUES DE MYCOBACTERIUM KANSASII

L'étude de structure des acides α-mycoliques de *Mycobacterium smegmatis* ayant conduit à une nouvelle formule pour ces acides, il était alors intéressant de vérifier si d'autres acides α-mycoliques avaient des structures analogues et notamment si on y retrouvait, dans la partie méromycolique, les longues chaines hydrocarbonées insaturées portant un groupement méthyle.

Dans ce chapitre les résultats obtenus avec *M. kansasii* (*) sont rapportés :

ISOLEMENT DES ACIDES

Par saponification des cires D de *M. kansasii* nous avons obtenu un mélange d'acides à partir duquel nous avons isolé les acides mycoliques bruts par le traitement selon Clermonté et Lederer (1). Le titrage de ce mélange indique un poids moléculaire de 1100 (poids d'équivalence). Nous proposons d'appeler les constituants de ce mélange *acides kansamycoliques.*

PURIFICATION ET PROPRIETES DES ACIDES α-KANSAMYCOLIQUES

Par chromatographie des esters méthyliques de ce mélange d'acides sur l'acide silicique et le gel de silice nous avons isolé les α-kansamycolates de méthyle : F = 45-47 $[\alpha]_D = +2,9°$. Cette fraction est homogène à la chromatographie sur couche mince selon Lanéelle (2), son analyse est en accord avec la formule $C_{82}H_{160}O_3$. Les acides α-kansamycoliques F : 56-59° ont été préparés par saponification des α-kansamycolates de méthyle. Leur analyse est en accord avec la formule : $C_{81}H_{158}O_3$.

Le spectre I.R. des α-kansamycolates de méthyle présente des bandes OH à 3535 et 3610 cm^{-1} avec un épaulement à 3580 cm^{-1} et des bandes à 1724 cm^{-1} et 1746 cm^{-1}. Par ailleurs une bande à 1025 cm^{-1} indique l'existence possible de cycles propaniques dans la molécule.

Le spectre de R.M.N. de cette fraction confirme l'existence de cycles propaniques : les signaux centrés à 35 cps et à -18 cps peuvent être attribués à des protons de cycles propaniques.

Il est à remarquer qu'il n'y a, sur ce spectre, aucun signal de protons vinyliques, ni allyliques.

(*) Il s'agit de l'espèce atypique photochromogène (souche n° 4) reçue du Docteur E.H. Runyon.

PRESENCE ET POSITION D'UN HYDROXYLE

Les acétyl-α-kansamycolates de méthyle (IIb) sont préparés par le traitement des α-mycolates de méthyle par l'anhydride acétique en présence de pyridine à 37°. Le spectre I.R. de ces acétates montre une bande à 1256 cm^{-1} et pas de bande OH. La bande à 1724 cm^{-1} (C = O chélaté) a disparu. Il y a aussi une bande à 1030 cm^{-1}.

L'analyse des acétyl-α-kansamycolates de méthyle est en accord avec la formule $C_{84}H_{162}O_4$.

Le spectre de R.M.N. permet de conclure qu'il n'y a qu'un seul groupement acétyle dans ces composés : la comparaison des surfaces du singulet à 220 cps attribuable aux trois protons du méthyle de l'ester et du singulet à 120 cps attribuable aux protons du groupement $CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-$, montre qu'il y a un seul groupement acétyle dans l'acétate et par conséquent, un seul hydroxyle dans les mycolates de méthyle de départ.

La position de l'hydroxyle dans la molécule découle de l'étude de la "nature mycolique" de ces esters. La chromatographie pyrolytique donne le pic du tétracosanoate de méthyle, ce qui montre leur nature α-ramifiée, β-hydroxylée. La spectrométrie de masse confirme également que les α-kansamycolates de méthyle donnent les pics du tétracosanoate de méthyle (voir ci-dessous).

α-KANSA-MEROMYCOLATES DE METHYLE (IIIb)

La pyrolyse des α-kansamycolates de méthyle (Ib) dans un tube à boules, sous vide, laisse un résidu que nous avons directement soumis à l'oxydation par Ag_2O alcalin, selon Asinger (3) et ensuite, à la chromatographie sur gel de silice. Les fractions éluées par le mélange benzène-éther (20 % d'éther dans le benzène) ont été estérifiées par le diazométhane et leur comportement en chromatographie sur couche mince (selon Lanéelle (2)) a été étudié ; on constate que les α-kansa-méromycolates de méthyle (IIIb), ont un Rf supérieur à celui du tétracosanoate de méthyle utilisé comme témoin (figure 1).

Le spectre I.R. des α-kansa-méromycolates de méthyle (IIIb) (figure 9 chapitre I) ne présente plus de bande OH ; une seule bande existe dans la région d'absorption des carbonyles à 1748 cm^{-1}. Ces esters présentent encore la bande à 1025 cm^{-1} du cycle propanique.

Le spectre de R.M.N. des α-kansa-méromycolates de méthyle présente également les signaux centrés à 35 et à -18 cps. La comparaison des surfaces d'un singulet à 217 cps attribuable aux trois protons du méthyle du groupement $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OCH_3$ et du signal à 35 cps semble montrer qu'il y a plus d'un cycle propanique dans la molécule.

Par ailleurs, la comparaison de la surface des signaux centrés sur le signal à 53 cps (attribuables aux protons des groupements méthyle $CH_3-(CH_2)_n-$) et celle du signal à 217 cps, montre qu'il ne doit pas y avoir de ramification dans cette molécule.

Pour confirmer l'existence de cycles propaniques, nous avons soumis un échantillon d'α-kansamycolates de méthyle au traitement par l'acide p-toluène

Figure 1 : Chromatoplaque des ésters méthyliques de certaines fractions de la chromatographie des acides α-kansa-meromycoliques ; les chiffres (14, 15 et 16) représentent les numéros des fractions de la chromatographie des acides méromycoliques (chromatographie IV) et T = tétracosanoate de méthyle témoin.

sulfonique 0,07 M dans l'acide acétique (4). Après ce traitement, le spectre de R. M. N. du produit obtenu montre que les signaux centrés à 35 cps et à -18 cps ont complètement disparu.

L'ensemble de ces résultats permet d'écrire la structure (Ia) pour les acides α-kansamycoliques.

SPECTROMETRIE DE MASSE

Un échantillon d'α-kansamycolates de méthyle a été soumis à la spectrométrie de masse dans un appareil MS9 à introduction directe et à double focalisation.

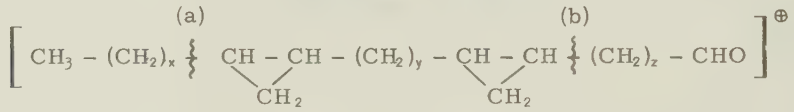
Dans la région des pics de masses les plus élevées, une série de pics existent à m/e = 1132, 1160 et 1188 (voir chapitre II, figure 8a). Des déterminations de masse montrent qu'il s'agit de pics à m/e = M-18 (M = masses moléculaires des mycolates de méthyle). Le pic moléculaire d'ester de pyrolyse a été obtenu à m/e = 382 (= tétracosanoate de méthyle). Une série de pics d'aldéhydes méromycoliques a été observée, indiquant que nous sommes en présence d'un mélange de mycolates de méthyle ; ces pics sont à m/e = 768, 796 et 824, correspondant à des aldéhydes de formules brutes $C_{54}H_{104}O$, $C_{56}H_{108}O$, $C_{58}H_{112}O$ (voir chapitre II, figure 8b).

La formation de pics de tétracosanoate de méthyle et d'aldéhydes méromycoliques s'explique, soit par la pyrolyse, soit par le réarrangement des ions moléculaires d'α-kansamycolates de méthyle (voir chapitre II).

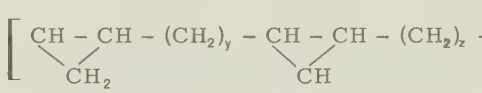
Pour vérifier que les pics à m/e = 768, 796 et 824 sont des pics moléculaires d'aldéhydes méromycoliques, un échantillon de méromycolates de méthyle a été également soumis à la spectrométrie de masse. Des pics moléculaires ont été obtenus à m/e = 798, 826 et 854, correspondant à des acides méromycoliques de formules brutes $C_{54}H_{104}O_2$, $C_{56}H_{108}O_2$ et $C_{58}H_{112}O_2$ (voir chapitre II, figure 8d) ; ceci confirme la correspondance parfaite des valeurs de masse moléculaire des aldéhydes méromycoliques et des méromycolates de méthyle (798 – 768 = 30, 826 – 796 = 30, 854 – 824 = 30).

Ces résultats indiquent, par ailleurs, l'existence de deux "insaturations" dans ces composés. Or, le spectre de R.M.N. montre qu'il s'agit de deux cycles propaniques.

Le spectre des α-kansamycolates de méthyle présente une série de pics à m/e = 515, 543, 571 (voir chapitre II, figure 8c). Les déterminations de masse effectuées montrent qu'il s'agit, dans chaque cas, d'un doublet(*) et que ces pics correspondent à $C_{36}H_{67}O + C_{37}H_{71}$, $C_{38}H_{71}O + C_{39}H_{75}$ et $C_{40}H_{75}O + C_{41}H_{79}$. Or, on peut attribuer les pics de fragments oxygénés à des coupures au niveau (a) et ceux des hydrocarbures à des coupures au niveau (b).

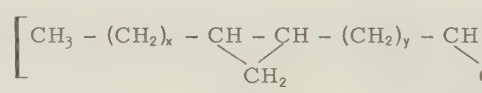


coupure selon (a)



m/e = $C_{36}H_{67}O$, $C_{38}H_{71}O$, $C_{40}H_{75}O$

coupure selon (b)



m/e = $C_{37}H_{71}$, $C_{39}H_{75}$, $C_{41}H_{79}$

ce qui laisse prévoir des valeurs nombreuses pour x, y et z, mais si l'on considère le pic d'aldéhyde le plus important, à m/e 796 (le pic du méromycolate correspondant à m/e = 826 est également le plus important), et si l'on admet que le pic à m/e = 543, qui est également le plus important lui correspond, on aura x + y + z = 48 ; x + y = 32 et y + z = 31, d'où x = 17, y = 15 et z = 16.

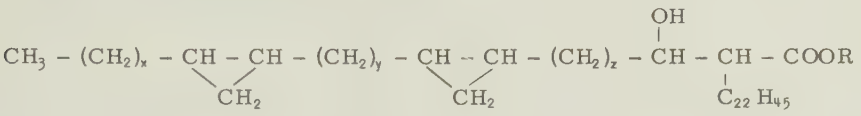
On peut alors écrire la structure (IV) pour l'acide α-kansa-méromycolique le plus abondant, et la structure (V) pour l'acide α-kansamycolique correspondant.

BIOGENESE

Les résultats ci-dessus permettent d'envisager un précurseur hypothétique commun (VI) aux acides α-kansa-méromycoliques et α-smegma-méromycolique (VII).

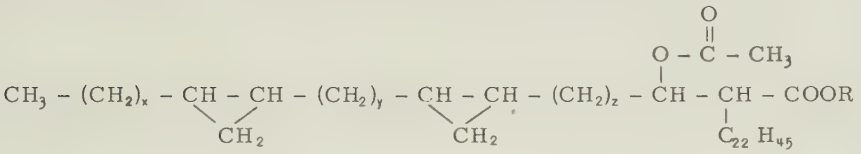
(*) Nous remercions le Dr. M. Barber d'avoir effectué ces mesures.

Le précurseur, méthylé sur le carbone 19 et désaturé sur les carbones 20 et 21 donnerait l'acide α-smegma-méromycolique, mais subissant une double "méthylénation" avec formation de deux cycles, aboutirait à l'acide α-kansa-méromycolique(*) (IV).



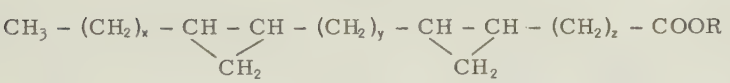
(Ia) R = H

(Ib) R = CH_3



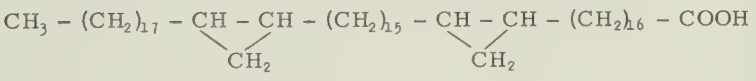
(II a) R = H

(II b) R = CH_3

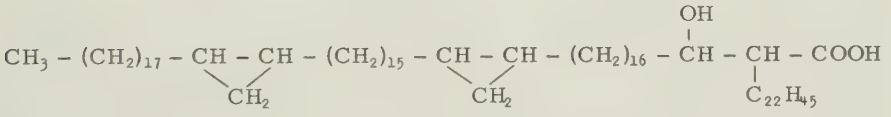


(III a) R = H

(III b) R = CH_3

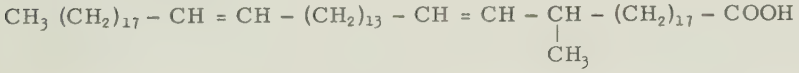


(IV)



(V)

(VI)



(VII)

(*) Voir aussi les chapitres VI et IX.

PARTIE EXPERIMENTALE

L'extrait chloroformique de *Mycobacterium kansasii* fractionné selon la méthode d'Anderson (5) modifiée par Asselineau et Lederer (6, 7), donne 20 % de cires B, 20 % de cires D et 60 % de cires C.

8 g de cires D ont été chauffés au reflux pendant 24 heures en présence de 100 ml de KOH méthanolique à 5 % contenant 30 ml de benzène ; on amène à sec, acidifie et reprend par l'éther ; après lavage on sèche les produits obtenus sur SO_4Na_2. On trouve 3,68 g d'étherosoluble. On épuise cet éthérosoluble par le méthanol bouillant (1) (6 fois par 35 cc de méthanol). L'insoluble présente un poids moléculaire moyen de 1100. Il représente 34 % des cires D. La dernière fraction soluble dans le méthanol a un poids moléculaire moyen de 610.

Après méthylation par le diazométhane, on obtient 2,76 g de produit que l'on chromatographie sur 80 g d'acide silicique en prenant des fractions de 250 ml (chromatographie I).

Chromatographie I

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg
1	Ether de pétrole	1
2	Ether de pétrole-Benzène 90:10	0
3	" " " " 85:15	29
4	" " " " 80:20	31
5	" " " " 70:30	133
6	" " " " 65:35	666
7	" " " " 60:40	383
8	" " " " "	225
9	Benzène	984
10	"	225
11	Benzène-éther 80:20	70
		Total : 2.747 mg

Les fractions 5, 6 et 7 de cette chromatographie sont réunies et de nouveau traitées par le méthanol bouillant, pour enlever les traces d'esters inférieurs éventuellement présents. Les trois essais ont donné 4 mg, 1 mg et 2 mg de produit soluble dans le méthanol. Cette expérience montre l'intérêt, dans certains cas, de l'essai de Clermonté et Lederer pour débarrasser des échantillons de mycolates de méthyle de Mycobactéries des esters inférieurs.

Avec un nouvel échantillon du mélange de kansamycolates de méthyle, nous avons fait une chromatographie plus fine. Dans cette expérience 3 g de kansamycolates de méthyle ont été chromatographiés sur 90 g de gel de silice ; on prend des fractions de 100 ml : (voir chromatographie II).

On constate que si la chromatographie I présente deux "pics" avec sommets sur les fractions 6 et 9, la chromatographie II présente trois "pics" avec sommets sur les fractions 16, 21 et 24. Il ne s'agit pas ici d'un "accident" de la chromatographie, puisque la fraction 21 de la chromatographie II

Chromatographie II

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg
1	Ether de pétrole	0
2 et 3	Ether de pétrole-Benzène 90:10	3
4 et 5	" " " " 85:15	0
6	" " " " 80:20	6
7	" " " " 75:25	10
8	" " " " 70:30	7
9	" " " " 70:30	19
10	" " " " 60:40	10
11	" " " " 55:45	46
12	" " " " 50:50	39
13	" " " " 45:55	5
14	" " " " 30:70	18
15	" " " " 25:75	146
16	" " " " 25:75	435
17	" " " " 25:75	309
18	" " " " 25:75	103
19	" " " " 10:90	50
20	Benzène	36
21	"	180
22	Benzène-éther 95:5	165
23	" " "	131
24	" " "	712
25	Benzène-éther 80:20	290
26	" " "	0
27	" " 50:50	17
28	" " "	10
		Total : 2747 mg

contient des mycolates de méthyle comportant un groupement méthoxyle (donc de type α'-mycolates de méthyle, voir chapitre V) alors que la fraction 24 contient les mycolates de méthyle cétonique (de type β-mycolique). L'étude rapportée dans ce chapitre concerne les fractions 5, 6 et 7 de la chromatographie I contenant les mêmes mycolates de méthyle que la fraction 16 de la chromatographie II. Ces mycolates, appelés α-kansamycolates de méthyle ont les propriétés suivantes :

F = 45-47°, $[\alpha]_D = +2,9°$ Analyse $C_{82}H_{160}O_3$:

Calc. %	C 82,55	H 13,42	OCH_3 2,60
tr.	82,22	13,42	2,70

Spectre I. R. : bandes OH à 3535, 3580 et 3610 cm^{-1}, bandes C = O à 1746 et 1724 cm^{-1} ; par ailleurs bandes à 1025 cm^{-1} et 3060 cm^{-1}.

Spectre de R. M. N. : signaux notamment à 35 cps et à -18 cps.

Spectre de masse notamment pics à m/e = 382, 515 543, 571, 768, 796, 824 , 1132, 1160 et 1188.

Acides α-kansamycoliques : 106 mg d'α-kansamycolates de méthyle ont été saponifiés par la KOH méthanolique, de manière habituelle. On obtient 104 mg d'acide. F : 56-59°.

Analyse $C_{81}H_{158}O_3$	Calc. %	C 82,51	H 13,41
	tr.	82,50	13,18

Acétyl-α-kansamycolates de méthyle : 102 mg d'α-kansamycolates de méthyle ont été dissous dans 0,4 ml de pyridine ; on y ajoute un mélange de 0,8 ml de pyridine + 0,3 ml d'anhydride acétique et on abandonne une nuit dans un tube à hémolyse à l'étuve (37°). Par traitement habituel on isole les acétates (102 mg) que l'on chromatographie sur 3 g d'acide silicique, élution : 9 ml pour chaque fraction (chromatographie III).

Chromatographie III

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg
1	Ether de pétrole	0
2	Ether de pétrole-benzène 90:10	0
3	" " " " 80:20	traces
4	" " " " 75-25	3
5	" " " " 65-35	37
6	" " " " 60-40	25
7	" " " " 50:50	16
8	Ether	17
		Total : 98 mg

Les fractions 5 et 6 ont été réunies : l'analyse est en faveur de la formule $C_{84}H_{162}O_4$:

Calc. %	C 81,68	H 13,12	O 5,18
tr.	81,24	13,23	5,37

Spectre I.R. : notamment bande à 1256 cm^{-1}, pas de bande OH. Spectre de R.M.N. : notamment singulets à 220 cps et 120 cps de même intensité.

α-kansa-méromycolates de méthyle : 158 mg d'α-kansamycolates de méthyle ont été chauffés dans un tube à boules à 270°-280° et le résidu de pyrolyse, 120 mg de produit, a été soumis à l'oxydation par Ag_2O alcalin comme il a été décrit pour l'oxydation d'α-smegma-méromycolals ; on obtient 109 mg d'acide que l'on chromatographie sur 3 g de gel de silice ; élution avec des fractions de 10 ml (voir chromatographie IV).

La chromatographie sur plaque de la fraction 14 et suivantes montre que ce sont des fractions acides : on utilise des plaques de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur et on élue avec le mélange d'éther de pétrole-éther (95-5). On traite alors ces fractions avec le diazométhane et on examine leur comportement par rapport au tétracosanoate témoin : Rf supérieur à celui du tétracosanoate. On réunit les fractions 15 et 16 estérifiées (30 mg) et on rechromatographie sur une colonne de gel de silice (chromatographie V).

Chromatographie IV

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg de produit
1	Ether de pétrole	3
2	Ether de pétrole-benzène 80:20	1
3	" " " " 70:30	2
4	" " " " 65:35	15
5	" " " " 65:35	5
6	" " " " 60:40	1
7	" " " " 60:40	1
8	" " " " 40:60	2
9	" " " " 20:80	2
10	Benzène	10
11	Benzène-éther 95:5	3
12	" " 90:10	2
13	" " 80:20	1
14	" " 80:20	5
15	" " 80:20	14
16	" " 80:20	18
17	" " 80:20	4
18	" " 80:20	3
19	" " 50:50	4
20	" " 50:50	3
21	Ether	1
22	Ether-ac. acétique 98:2	traces
		Total : 100 mg

Chromatographie V

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg de produit
1	Ether de pétrole 90:10	0
2	Ether de pétrole-benzène 80:20	0
3	" " " " 80:20	4
4	" " " " 80:20	16
5	" " " " 80:20	9
6	Ether	traces
		Total : 29 mg

Ces fractions sont réunies : F : 58-64°, Spectre I. R. bandes à 1748 cm^{-1} et 1025 cm^{-1}. R.M.N. signaux à 217 cps, 53 cps, 35 cps et -18 cps. Spectrométrie de masse : sur un appareil à introduction directe et à double focalisation (A. E. I., Manchester) : pics moléculaires à m/e = 798, 826 et 854.

Ouverture des cycles : Un échantillon de 60 mg du mélange des fractions 5, 6 et 7 de la chromatographie I est traité dans un tube scellé par 5 ml d'une solution d'acide paratoluène sulfonique 0, 07 M, dans l'acide acétique à 50°, pendant trois jours. Par traitement habituel on isole l'éthérosoluble, 56 mg.

Sur le spectre de R.M.N. de cet éthérosoluble les signaux à 35 cps et à -18 cps ont complètement disparu.

BIBLIOGRAPHIE

(1) R. CLERMONTE et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci., 242, 2600 (1956).

(2) G. LANEELLE - C.R. Acad. Sci, 257, 781 (1963).

(3) F. ASINGER - Ber., 75, 656 (1942).

(4) R. T. LALONDE et L.S. FORTNEY - J. Am. Chem. Soc. 85, 3767 (1963).

(5) R.J. ANDERSON - Fortshr. Chem. Organ. Naturst., 3, 145 (1939).

(6) J. ASSELINEAU - Thèse, Doctorat d'Etat, Paris, 1950. Ed. Arnette, 1951.

(7) A. AEBI, J. ASSELINEAU, E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 661 (1953).

CHAPITRE V

SUR LA STRUCTURE DES ACIDES α-MYCOLIQUES DE LA SOUCHE HUMAINE TEST DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Ayant auparavant étudié la structure des acides α-mycoliques d'une Mycobactérie saprophyte *(M. smegmatis)* et d'une espèce atypique *(M. Kansasii)* et, ayant constaté la grande analogie de structure qui existe entre ces acides, il nous a paru intéressant d'étudier les acides mycoliques d'une espèce humaine virulente de Mycobactéries. Nous avons choisi la souche Test, dont les acides mycoliques ont déjà été étudiés. Quatre acides mycoliques sont connus, dont deux en O_4 et deux en O_3 appelés α, β, γ et δ ou 1, 2, 3 et 4 suivant l'ordre d'élution des acides libres d'une colonne d'alumine (1, 2).

L'acide α-mycolique étudié dans ce chapitre est le second(*) à être élué au cours de la chromatographie des esters méthyliques sur une colonne de gel de silice. Il est peut être identique à l'acide γ-mycolique (ou acide 3-hydroxy mycolanoique [3 Test]) $C_{87}H_{174}O_3$, décrit précédemment ; il est néanmoins à noter que cet acide ne représentait que 1,5 % du mélange d'acides étudié (2), alors que l'acide dont nous rapportons ici la structure est quantitativement le plus important dans le mélange.

ISOLEMENT

Les cires D de la souche Test de *M. tuberculosis* ont été saponifiées comme décrit précédemment (1).

Les acides mycoliques (4,1 g) ont été estérifiés par le diazométhane et chromatographiés sur gel de silice. On suit la marche d'élution par chromatographie sur couche mince selon Lanéelle (3). Les fractions 17 à 32 de la chromatographie sur colonne (1884 mg) donnent une tache principale ; les produits correspondants sont appelés α-mycolates de méthyle Test. Les fractions 17 à 22 contiennent une "impureté" de Rf supérieur mais voisin de celui des α-mycolates Test ; nous appelons les produits correspondants les "pré-α-mycolates Test". De tels esters sont également isolés de *M. smegmatis* et de *M. Kansasii*. Dans le présent travail nous proposons des structures pour les acides α-mycoliques Test.

PROPRIETES PHYSIQUES

Les α-mycolates de méthyle Test (Ib) que nous avons isolés ont les propriétés suivantes : F = 45-50°, $[\alpha]_D = +2,7°$ ($CHCl_3$) ; leur analyse élémentaire

---

(*) Il s'agit, en fait, d'un mélange d'homologues.

est en accord avec la formule $C_{79}H_{154}O_3$ (nous verrons que le produit principal du mélange des esters a effectivement cette formule).

Le spectre I.R. des α-mycolates de méthyle Test présente des bandes C = O à 1728 cm^{-1} et à 1747 cm^{-1} ; par ailleurs une bande à 1030 cm^{-1} indique la possibilité de l'existence de cycles propaniques dans la molécule.

Le spectre de R.M.N. de cette fraction (figure 3, chapitre I) confirme l'existence de cycles propaniques ; on observe en effet des signaux à 35 cps et à -18 cps (4). Sur ce spectre, il n'existe pas de signal de protons de groupement méthoxyle autre que celui du groupement méthyle de l'ester.

Rappelons que la présence de cycle propanique a également été observée dans des mélanges d'acides mycoliques isolés de quelques souches humaines et bovines de *Mycobacterium tuberculosis* (5).

PRESENCE ET POSITION D'UN HYDROXYLE

Les analyses élémentaires des α-mycolates de méthyle de la souche Test sont en accord avec une formule en O_3.

La présence d'un hydroxyle (et d'un seul) est indiquée par l'analyse des acétyl-α-mycolates de méthyle Test (IIb), préparés en traitant les mycolates de méthyle par l'anhydride acétique en présence de pyridine (F. 38-42°) ; cette analyse est en accord avec la formule $C_{81}H_{156}O_4$; le spectre I.R. présente une bande à 1260 cm^{-1}, mais pas de bande OH. Le spectre de R.M.N. (figure 5, chapitre I) montre qu'il n'y a qu'un seul groupement acétyle par molécule (comparaison des signaux à 117 cps et à 217 cps)(*).

La position de l'hydroxyle en β du carboxyle découle de l'étude de la "nature mycolique" des mycolates de méthyle. La spectrométrie de masse montre que l'ester de pyrolyse est l'hexacosanoate de méthyle accompagné d'une faible proportion (6 % environ) de tétracosanoate de méthyle.

α-MEROMYCOLATES DE METHYLE TEST (IIIb)

Par pyrolyse d'α-mycolates Test dans un tube à boules et chromatographie préparative sur plaque du résidu, nous avons isolé les aldéhydes α-méromycoliques Test ; le spectre I.R. de ces aldéhydes présente une bande d'absorption à 1738 cm^{-1} due au C = O du groupement aldéhyde et une bande à 2724 cm^{-1} due à la vibration C – H de ce groupement (figure 6 chapitre I). Le spectre de R.M.N. (figure 7, chapitre I) présente un triplet centré à 585 cps dû au proton du groupement aldéhyde, ce qui indique qu'il y a deux protons sur le carbone en α et que, par conséquent, le carbone en γ de mycolates de méthyle de départ ne présente pas de ramification.

Par oxydation des aldéhydes méromycoliques par l'oxyde d'argent alcalin, selon Asinger (6), nous avons obtenu les acides méromycoliques dont nous avons purifié les esters méthyliques par chromatographie préparative sur plaque.

(*) Il n'y a pas lieu d'incriminer ici la déshydratation, au cours de l'acétylation, puisqu'une telle déshydratation conduit obligatoirement à l'apparition de protons oléfiniques et allyliques. Le spectre de R.M.N. n'est pas en faveur de la formation de tels protons.

Le spectre I.R. des α-méromycolates de méthyle présente une bande à 1748 cm^{-1} et pas de bande OH ; on observe également la bande à 1030 cm^{-1}. Le spectre de R.M.N. (figure 1) présente des signaux à 35 cps et à -18 cps. La comparaison de la surface du signal à 35 cps à celle du signal à 53 cps attribuable aux protons de groupement méthyle de type $CH_3-(CH_2)_n$ montre qu'il y a plus d'un cycle propanique dans la molécule. Il est à noter que ce spectre (ainsi que celui des mycolates de méthyle de départ) ne montre pas de signal attribuable aux protons oléfiniques.

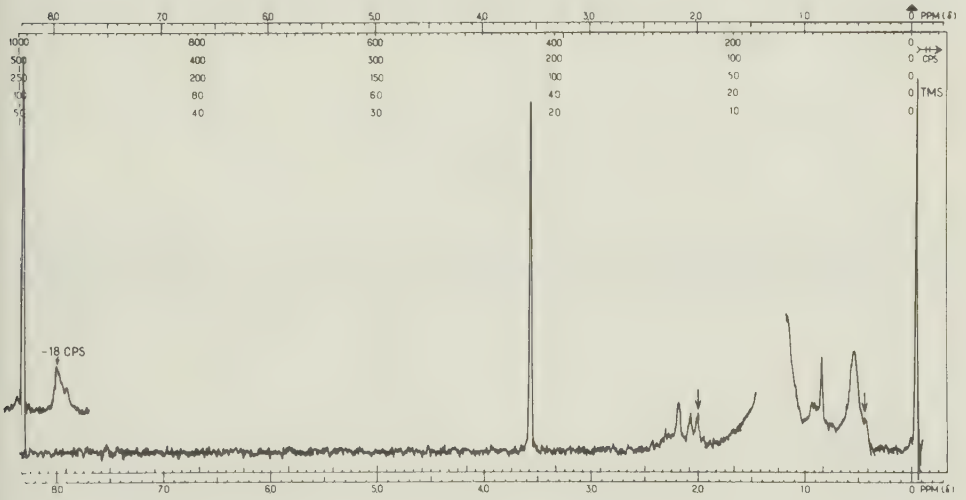


Figure 1 : Spectre de R.M.N. des α-méromycolates de méthyle Test. Les flèches vers la droite du spectre indiquent les bandes latérales de rotation.

La comparaison des signaux centrés à 53 cps et du singulet à 215 cps (CH_3 du groupement ester) semble indiquer qu'il n'y a pas de ramifications dans cette molécule. Les résultats mentionnés ici permettent d'écrire les structures IIa pour les acides α-méromycoliques Test et Ia pour les acides α-mycoliques correspondants.

SPECTROMETRIE DE MASSE

Un échantillon des α-mycolates de méthyle Test a été soumis à la spectrométrie de masse dans un appareil MS 9 (A.E.I., Manchester) à haute résolution et à double focalisation : les pics de masses les plus élevés, sont à m/e = 1132, 1160, 1188 et 1216 (figure 2a) ; il s'agit de pics d'anhydromycolates de méthyle ($C_{79}H_{152}O_2$, $C_{81}H_{156}O_2$ $C_{83}H_{160}O_2$ et $C_{85}H_{164}O_2$). On observe également une série de pics à m/e = 1100, 1128, etc. qui correspondent à M − (18 + 32). Les mycolates de méthyle Test ont donc les formules brutes suivantes : $C_{79}H_{154}O_3$, $C_{81}H_{158}O_3$, $C_{83}H_{162}O_3$ et $C_{85}H_{166}O_3$.

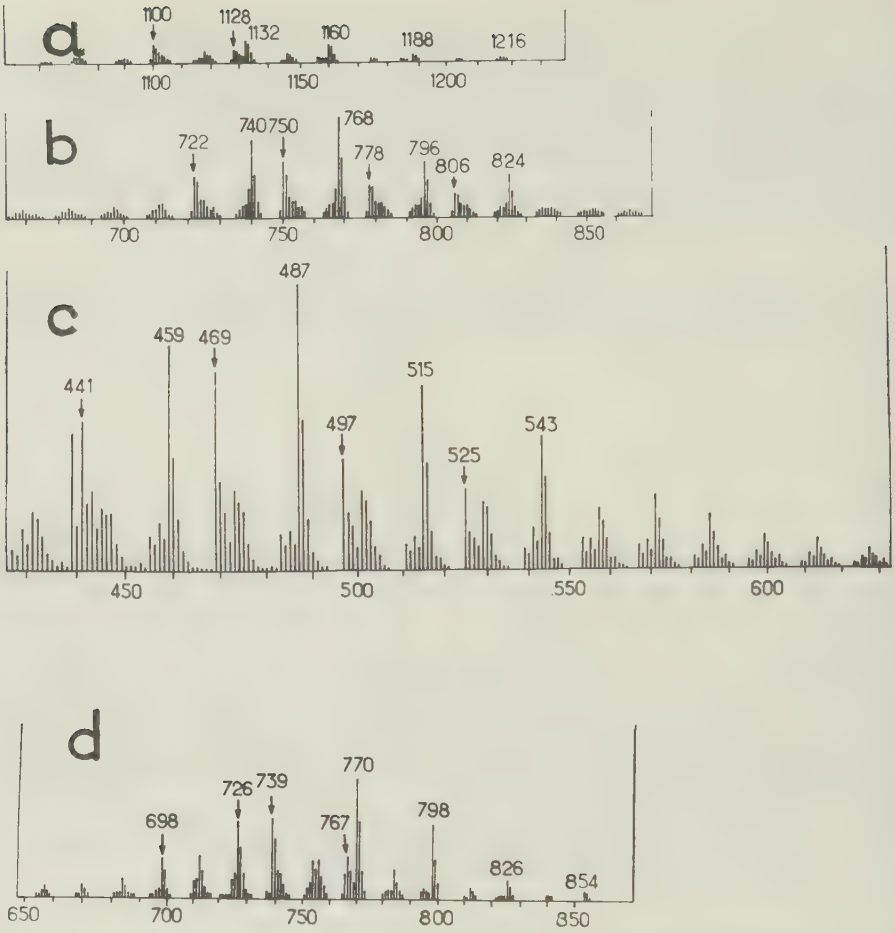


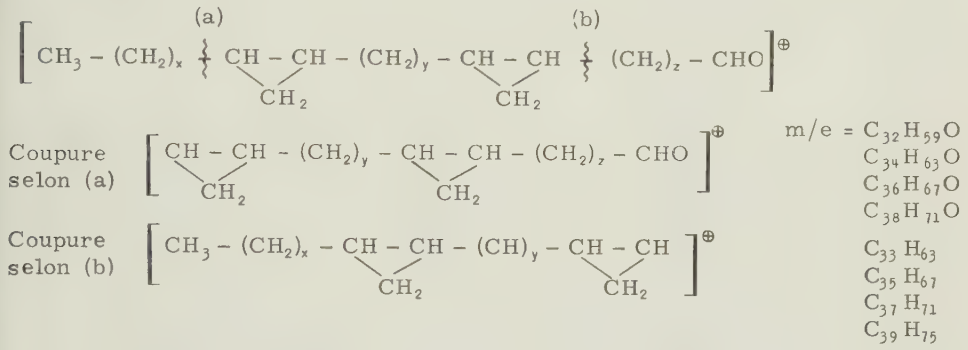
Figure 2 : a, b, et c : spectre de masse des α-mycolates de méthyle Test.
d : spectre de masse des α-méromycolates de méthyle Test.

Les pics moléculaires des méroaldéhydes sont à m/e 740, 768, 796 et 824 (figure 2b). Ces aldéhydes correspondent à des produits à nombre pair d'atomes de carbone de formules brutes $C_{51}H_{99}$ – CHO, $C_{53}H_{103}$–CHO, $C_{55}H_{107}$CHO et $C_{57}H_{111}$ – CHO. Des pics existent également sur ce spectre à m/e = 722, 750, 778 et 806 ; ils correspondent à M – 18 pour les aldéhydes méromycoliques ; Ils sont de plus faible intensité que les pics moléculaires correspondants. Sur ce spectre, on observe également le pic moléculaire de l'ester de pyrolyse à m/e = 410 (hexacosanoate de méthyle), ainsi que des pics de fragmentation.

L'existence des pics d'ester et des méro-aldéhydes s'explique soit par la pyrolyse, soit par le réarrangement de l'ion moléculaire (voir chapitre II).

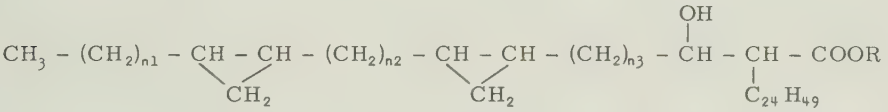
Pour vérifier que les pics à m/e = 740, 768, 796 et 824 sont des pics

d'aldéhydes méromycoliques, on soumet les méromycolates de méthyle correspondants à la spectrométrie de masse. Des pics moléculaires s'obtiennent à m/e = 770, 798, 826 et 854 (figure 2d) ce qui montre la correspondance des valeurs des masses moléculaires des aldéhydes méromycoliques et des méromycolates de méthyle. Des pics s'observent sur le spectre des méromycolates à M – 31 (pics à m/e = 739, 767, 795, etc.). Une série de pics existe sur le spectre de masse des α-mycolates de méthyle Test à m/e = 459, 487, 515, 543 etc. (figure 2c). D'après les mesures de masse effectuées(*) il s'agit de doublets correspondant à $C_{32}H_{59}O + C_{33}H_{63}$, $C_{34}H_{63}O + C_{35}H_{67}$, $C_{36}H_{67}O + C_{37}H_{71}$, $C_{38}H_{71}O + C_{39}H_{75}$ (voir ce phénomène pour les α-kansamycolates de méthyle (chapitre IV)), on peut attribuer les pics des fragments oxygénés aux coupures des aldéhydes selon (a) et les pics d'hydrocarbures aux coupures selon (b) :



ceci laisse prévoir des valeurs nombreuses pour x, y et z. Cependant si l'on considère le pic moléculaire le plus important des méromycolates à m/e = 770 (figure 2d) (le pic moléculaire de l'anhydromycolate correspondant à m/e = 1132 est également le plus important (figure 2a))(**) et si on admet que le pic à 487 (figure 2c) qui est également le plus important lui correspond, on aura : x + y + z = 44, x + y = 28, y + z = 27 d'où x = 17, Y = 11 et z = 16 et on peut alors proposer la structure (IV) pour l'acide mycolique le plus abondant dans le mélange.

On constate qu'il s'agit d'une structure très voisine de celle de l'acide α-kansamycolique le plus abondant (V) dont la structure a pu être proposée par une interprétation analogue de son spectre de masse. Le fragment méromycolique contient dans le dernier cas 4 carbones de plus alors que l'acide de pyrolyse en contient deux de moins.

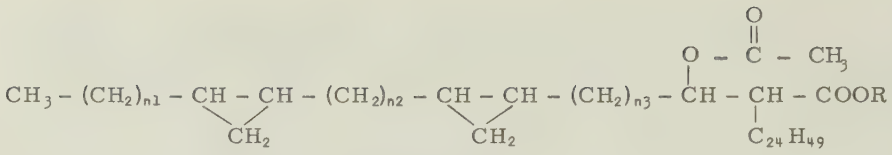


I a R = H

I b R = CH_3

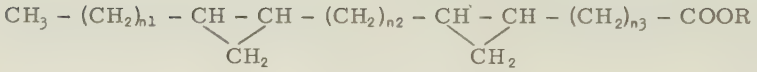
(*) Nous remercions Monsieur W. A. Wolstenholme d'avoir effectué les spectres et les mesure de masse.

(**) En ce qui concerne les pics des méroaldéhydes (figure 2b), celui à 740 devrait être le plus important ; en fait, le pic de l'aldéhyde à m/e = 768 lui est égal et même légèrement plus important.



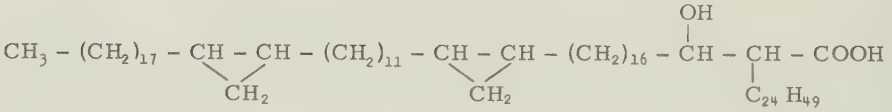
IIa R = H

IIb R = CH_3

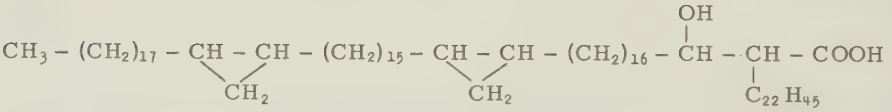


IIIa R = H

IIIb R = CH_3



IV



V

PARTIE EXPERIMENTALE

SAPONIFICATION DES CIRES D

9,8 g de cires D de la souche Test de *M. tuberculosis* ont été dissous dans 40 ml de benzène et additionnés de 40 ml de KOH méthanolique à 2,5 %. On chauffe au reflux pendant 72 heures, on décante le surnageant, on traite le résidu plusieurs fois au benzène bouillant. On concentre les liquides de décantation et d'épuisement, on acidifie et on reprend l'éthérosoluble. On obtient 4,7 g de produit que l'on dissout dans 15 ml d'éther et précipite avec 30 ml de méthanol. On centrifuge et on lave le culot au méthanol. Cette opération, répétée deux fois, laisse un culot de 4,1 g de produit que l'on estérifie par le CH_2N_2 et chromatographie sur 126 g de gel de silice. On utilise 100 ml d'éluant pour chaque élution (voir chromatographie I).

L'allure de cette chromatographie permet de distinguer plusieurs "pics" dont le plus important comprend les fractions 17 à 32 soit 1884 mg. Ces fractions examinées par chromatographie sur couche mince ne sont pas pures : les fractions 17 à 22 contiennent un produit dont le Rf est supérieur mais voisin à celui du produit principal ; ce dernier est appelé α-mycolates de

Chromatographie I

Fraction	Nature de l'éluant		Quantité de produit en mg.
1 à 6	Ether de pétrole à éther de pétrole-benzène	75:25	0
7	Ether de pétrole-benzène	70:30	1
8	" " " "	65:35	14
9 à 14	" " " "	"	120
15	" " " "	60:40	19
16	" " " "	"	28
17 à 32	" " " "	55:45	1.884
33	" " " "	"	17
34	" " " "	50:50	17
35	" " " "	45:55	14
36	" " " "	40:60	21
37	" " " "	35:65	36
38 à 50	" " " "	"	1.110
51	" " " "	30:70	25
52	" " " "	25:75	31
53	" " " "	"	69
54 à 56	" " " "	20:80	187
57 à 58	" " " "	10:90	118
59 à 60	Benzène		37
61	Benzène-éther	90:10	15
62	"	50:50	13
63	Ether		23
64 à 67	Ether-ac. acétique	95:5	62
			Total : 3.861 mg

méthyle Test et le produit de Rf supérieur pré-α-mycolates Test. Les fractions 23 à 32 donnent une seule tache et ne contiennent pas d'impureté. L'étude s'est portée sur les fractions 24 à 27 principalement : F = 45-50° $[\alpha]_D$ =+ 2,7°.

Analyse : $C_{79}H_{154}O_3$	Calc. %	C 82,43	H 13,30	O 4,18	OCH_3 1,30
	tr.	82,37	13,58	4,22	1,43

Spectre I.R. dans CCl_4 et CS_2 (bandes à 1030 et 3060 cm^{-1} et 1728 et 1747 cm^{-1}). Spectre de R.M.N. (signaux à 220 cps, 54 cps, 36 cps et -18 cps).

ACETYL-α-MYCOLATES DE METHYLE TEST

84 mg d'α-mycolates de méthyle Test sont dissous dans 0,6 ml de pyridine ; on ajoute un mélange de 1,5 ml de pyridine et de 0,5 ml d'anhydride acétique. On abandonne une nuit à l'étuve à 37° et par traitement habituel on isole 75 mg de produit que l'on chromatographie sur 2 g de gel de silice. L'élution se fait avec 6 ml de solvant pour chaque élution (voir chromatographie II).

Chromatographie II

Fraction	Nature de l'éluant		Quantité de produit en mg.
1 à 5	Ether de pétrole jusqu'à éther de pétrole-benzène	70:30	0
6 et 7	Ether de pétrole-benzène	50:50	4
8	" " " "	40:60	2
9	" " " "	20:80	3
10	Benzène		2
11	Benzène-éther	95:5	6
12	" "	90:10	13
13	" "	80:20	9
14	" "	70:30	14
15	" "	50:50	14
16	" "	" "	traces
17	Ether		0
			Total : 67 mg

Les fractions 11 à 15 sont mélangées. Ce mélange donne une seule tache à la chromatographie sur couche mince. F = 38-42°.

Analyse : $C_{81}H_{156}O_4$: Calc. % C 81,54 H 13,17

tr. 81,24 13,33

81,08 13,15

Spectre I.R. : bande à 1260 et pas de bande OH. Spectre de R.M.N. : notamment singulet à 117 cps et à 217 cps de même intensité.

MEROMYCOLATES DE METHYLE TEST

133 mg de mycolates de méthyle sont pyrolysés dans un tube à boules. Le résidu est traité directement par l'oxyde d'argent alcalin, selon Asinger, comme nous l'avons déjà décrit (chapitre III). Les produits de l'oxydation, 85 mg, sont estérifiés et les méromycolates purifiés par chromatographie préparative sur plaque. On obtient ainsi 56 mg de méromycolates Test : F = 50-53°. Spectre I.R. : bandes notamment à 1747 cm^{-1} et 1030 cm^{-1}. Spectre de R.M.N. : signaux à 215 cps, 53 cps, 35 cps et -18 cps. Spectre de masse : pics moléculaires à m/e = 770-854.

Dans une expérience parallèle, 90 mg d'α-mycolates Test ont été pyrolysés ; on obtient 63 mg d'aldéhydes. Ces aldéhydes ont été purifiés par chromatographie sur plaque préparative : spectre I.R. bandes à 1738 et 2724 cm^{-1}. Spectre de R.M.N. triplet à 585 cps.

BIBLIOGRAPHIE

(1) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acata 7, 126, (1951).

(2) J. ASSELINEAU - Biochim. Biophys. Acta, *10*, 453, (1953), voir aussi - Les lipides Bactériens ; Isolement, Composition, propriétés. Ed. Hermann, Paris, 350 pages, 1962.

(3) G. LANEELLE - C.R. Acad. Sci., 257, 781 (1963).

(4) C.Y. HOPKINS et H.J. BERNSTEIN - Can. J. Chem., 775, *37*, (1959).

(5) M. GASTAMBIDE-ODIER, J.M. DELAUMENY et E. LEDERER - C. R. Acad. Sci., *259*, 3404, (1964).

(6) F. ASINGER - Ber., 75, 656, (1942).

CHAPITRE VI

SUR LA BIOGENESE DES ACIDES α -SMEGMAMYCOLIQUES

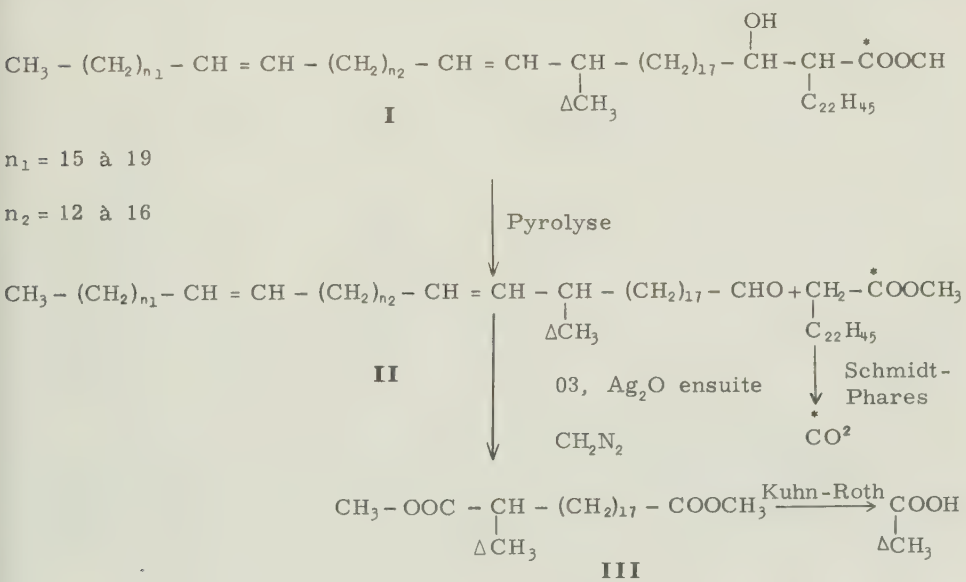
Ayant démontré la structure I pour les acides α-smegmamycoliques, il était alors intéressant d'en déterminer l'origine biogénétique.

Deux ramifications sont présentes dans ces acides ; un groupement docosyle et un groupement méthyle.

Une telle structure n'est pas en accord avec le schéma de biogénèse présenté pour les acides mycoliques (voir l'introduction). Elle ne semble pas, par contre, laisser d'ambiguïté sur l'origine de la longue chaîne hydrocarbonée du fragment "méromycolique" : cette chaîne pourrait se synthétiser par un "travail de routine", à savoir, conformément à la règle "acétate-malonate"(*), (**).

Dans ce chapitre nous décrivons les résultats concernant l'origine biogénétique des ramifications, le groupement docosyle et le groupement méthyle.

Les réactions de dégradation utilisées dans ce chapitre sont indiquées ci-dessous :



(*) pour une revue sur les domaines de la validité de cette règle voir par exemple (1).

(**) voir néanmoins chapitre IX.

A - ORIGINE BIOGENETIQUE DU GROUPEMENT DOCOSYLE

Une souche de *M. smegmatis* a été cultivée sur deux litres de milieu de Sauton pendant dix jours en présence du sel de potassium de 3 mg d'acide tétracosanoïque 1 - ^{14}C (activité totale 9.10^6 c/min)(*), (**).

Les bactéries ont été filtrées et encore humides traitées par la potasse méthanolique. L'éthérosoluble est soumis au traitement selon Clermonté et Lederer (2) et estérifié par le diazométhane. Par chromatographie sur gel de silice on isole une fraction éluée par le mélange éther de pétrole-benzène (45-55) donnant une seule tache à la chromatographie sur couche mince, selon Lanéelle (3) dont le Rf est égal à celui des α-smegmamycolates de méthyle. Ce produit présente 300 c/min/mg. Après avoir montré qu'il ne contient pas de tétracosanoate de méthyle (voir partie expérimentale) on en soumet un échantillon à la pyrolyse.

La pyrolyse de 60 mg d'α-smegmamycolates de méthyle (300 c/min/mg), donne 15 mg de tétracosanoate de méthyle (760 c/min/mg) et 45 mg d'aldéhydes méromycoliques bruts qui sans autre purification ne présentent que 110 c/min/mg. Ainsi 70 % de l'activité des α-smegmamycolates de méthyle se retrouvent dans le tétracosanoate de pyrolyse.

La décarboxylation selon Schmidt et Phares (4, 5, 6) de 14,65 mg d'acide tétracosanoïque contenant 4,65 mg d'acide tétracosanoïque provenant de la pyrolyse (3554 c/min) a donné 8,7 mg de CO_3Ba ayant une activité de 3040 c/min. soit 86 % de l'activité de l'acide tétracosanoïque et 10 mg d'une amine faiblement radioactive (activité totale : 368 c/min).

La décarboxylation a été presque totale : la trace d'acide récupérée de cet essai n'avait qu'une activité négligeable (37 c/min).

Le tableau (I) résume les résultats de mesure de la radioactivité.

Tableau I

Résumé des résultats de mesure de la radioactivité, activité donnée en c/min/mg.

	α-smegmamycolates de méthyle	Aldéhydes méromycoliques	Tétracosanoate obtenu par pyrolyse	Tricosylamine	CO_2 obtenu par décarboxylation de l'acide tétracosanoïque
Activité en c/min/mg	300	110	760	112	5.467

Ces résultats démontrent clairement :

1/ que l'acide tétracosanoïque est incorporé tel quel ; les carbones 1 et 2 et la ramification en α trouvent leur origine dans l'acide tétracosanoïque.

(*) Pour la synthèse de l'acide tétracosanoïque marqué voir la partie expérimentale.

(**) Les radioactivités indiquées dans ce travail ont été mesurées à l'aide d'un appareil "Nuclear Chicago Gaz Folw Counter" ayant un rendement d'environ 20 %.

2/ qu'une seule molécule de cet acide est utilisée pour la biosynthèse des acides α-smegmamycoliques.

La longue chaîne hydrocarbonée des acides smegmamycoliques ne semble pas provenir d'un simple rallongement de chaîne à partir de l'acide tétracosanoïque. La faible activité que présentent l'aldéhyde méromycolique et la tricosyl-amine doit provenir d'une distribution au hasard de la radioactivité dont l'origine est probablement le catabolisme de l'acide tétracosanoïque.

B - ORIGINE BIOGENETIQUE DU GROUPEMENT METHYLE

M. smegmatis a été cultivé sur 2 litres de milieu de Sauton, en présence de 40μC de méthionine – $^{14}CH_3$ ($18,8\ 10^6$ c/min). Après le traitement habituel (voir la partie expérimentale) on isole 236 mg d'α-smegmamycolates de méthyle présentant 1330 c/min/mg (activité totale 314.10^3 c/min).

La dégradation selon Kuhn-Roth (7, 8) des α-smegmamycolates de méthyle a montré que 75 à 80 % de la radioactivité de cette substance se trouvaient dans l'acide acétique obtenu. Les résultats de ces dégradations sont reportés dans le tableau II.

Tableau II

Résumé des résultats de mesure de la radioactivité, dégradation selon Kuhn-Roth des α-smegmamycolates de méthyle, activité donnée en c/min.

Produit examiné	Activité totale	Activité retrouvée dans l'acide acétique	Activité retrouvée dans le CO_2	% de l'activité retrouvée dans l'acide acétique
α-smegmamycolates de méthyle (6,2 mg)	8.200	6.300	1.750	78 %
α-smegmamycolates de méthyle (3,6 mg)	4.800	3.400	1.050	76 %

Afin de préciser la position du groupement méthyle radioactif des acides α-smegmamycoliques, nous avons soumis un échantillon d'esters méthyliques de ces acides à la dégradation par pyrolyse, suivie d'ozonolyse.

La pyrolyse de 50,7 mg d'α-smegmamycolates de méthyle (I) a donné 11,3 mg de tétracosanoate de méthyle ayant une activité de 50 c/min/mg et 39 mg d'aldéhydes méromycoliques (II), qui présentent 1550 c/min/mg. Après ozonolyse, oxydation par Ag_2O (9) et méthylation par le diazométhane, on isole 2 mg d'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle (III) par chromatographie sur plaque ; après sa purification par chromatographie en phase vapeur, ce composé présente une activité de 4200 c/min/mg.

Les résultats de mesure de la radioactivité sont résumés dans le tableau III.

Tableau III

Résumé des résultats de mesure de la radioactivité, activité donnée en c/min/mg.

	α-smegma-mycolates de méthyle I	tétracosanoate obtenu par pyrolyse	aldéhydes méromycoliques II	α-méthyl-eicosanedioate de méthyle III
Activité en c/min/mg.	1.330	50	1.550	4.200

La dégradation selon Kuhn-Roth de l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle a montré que la radioactivité se trouvait dans le groupement méthyle de ce composé : 87 % de la radioactivité ont été récupérés dans l'acide acétique provenant de l'oxydation sulfochromique.

Ces résultats montrent clairement que la méthionine constitue la source du groupement méthyle des acides α-smegmamycoliques.

En conclusion : Les résultats rapportés dans ce chapitre permettent de penser que la biosynthèse des acides smegmamycoliques (I) procède, en dernière étape, par la condensation d'un acide méromycolique (IV) avec l'acide tétracosanoïque (l'un et l'autre se trouvant évidemment sous une forme activée) :

$$CH_3 - (CH_2)_{n_1} - CH = CH - (CH_2)_{n_2} - CH = CH - \underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}} - (CH_2)_{17} - COOH + \underset{\displaystyle C_{22}H_{45}}{\underset{|}{CH_2}}\,COOH$$

(IV)

Ainsi, la possibilité de la condensation mycolique proposée par Asselineau et Lederer (10) (voir aussi 11, 12, 13 et 14) et vérifiée pour l'acide corynomycolique ($C_{32}H_{64}O_3$) par Gastambide-Odier et Lederer (14) est encore une fois prouvée.

Les acides méromycoliques semblent d'ailleurs exister, dans le bacille, à l'état naturel, en faible quantité (15).

Dans une étude sur la biogénèse de l'acide tuberculostéarique chez *M. phlei*, Lennarz et Coll (16) ont rapporté que 30 à 50 % de la radioactivité provenant de la méthionine – $^{14}CH_3$ se trouvaient dans "des lipides relativement non volatils de caractère acide".

Nos observations sur l'incorporation du carbone du groupement méthyle de la méthionine dans la ramification méthyle des acides α-smegmamycoliques ainsi que la possibilité de l'existence de cycles propaniques dans les acides mycoliques (voir chapitres IV et V et la référence (17)) donnent l'explication de cette observation.

PARTIE EXPERIMENTALE

A - ORIGINE BIOGENETIQUE DU GROUPEMENT DOCOSYLE

Préparation de l'acide 1 - ^{14}C tétracosanoïque

Cet acide a été préparé par les réactions suivantes, à partir de l'acide tétracosanoïque non marqué :

$$2\ C_{23}H_{47} - COOH + 2\ Br_2 + HgO \longrightarrow 2\ C_{23}H_{47}Br + H_2O + Br_2Hg + 2\ CO_2$$

$$C_{23}H_{47}Br + \overset{*}{C}NK \longrightarrow C_{23}H_{47} - \overset{*}{C}N + KBr \xrightarrow[(KOH)]{\text{hydrolyse}} C_{23}H_{47} - \overset{*}{C}OOH$$

La préparation du bromure de tricosyle a été faite selon Cristol et Fritz Jr (18) ; 2,3 g d'acide tétracosanoïque sont additionnées de 1,4 g d'oxyde rouge de mercure ; on ajoute 5 ml de CCl_4 et on chauffe au reflux pendant 3 h à l'obscurité. On ajoute alors du brome en excès et on chauffe encore pendant 3 h. On ajoute ensuite de l'éther de pétrole au mélange réactionnel et on laisse refroidir, puis on filtre ; le filtrat est traité par un excès de NO_3H. On amène ensuite à la neutralité et on reprend par l'éther de pétrole ; on sèche sur SO_4Na_2. 2,6 g de produit sont obtenus. On chromatographie alors sur le mélange silicate de Mg-célite (2 : 1) ; les deux premières fractions de la chromatographie (1,12 g), éluées par l'éther de pétrole, sont constituées par le bromure de tricosyle (F. 50-51°). Analyse $C_{23}H_{47}Br$

calc. % :	C 68,48	H 11,66	Br 19,85
tr. :	68,50	11,83	19,85

Ce bromure est utilisé pour la synthèse de l'acide tétracosanoïque. A un mélange de 3 mg de $\overset{*}{C}NK$ solide (0,5 mc) et de 5,68 mg de cyanure de K non marqué, on ajoute 3 ml d'alcool à 95 %. 103 mg (excès) de bromure de tricosyle sont dissous dans 0,5 ml de benzène et additionnés au cyanure de potassium. On chauffe au reflux pendant 3 jours en ajoutant de temps à autre quelques gouttes d'alcool à 95 % ; on laisse refroidir et on sépare l'éthérosoluble : 91 mg.

230 mg de KOH sont d'abord additionnés de 0,1 ml d'eau, puis de 1 ml d'alcool à 95 %. On introduit alors l'éthérosoluble de la réaction précédente (contenant le nitrile) solubilisé dans 0,4 ml de benzène. Le mélange est chauffé au reflux pendant 5 jours ; on ajoute de temps en temps 0,2 ml d'alcool à 95 % ; ensuite, on sépare le neutre. On acidifie et sépare l'acide tétracosanoïque (34 mg) que l'on chromatographie sur l'alumine II. La fraction éluée avec l'éther-acide acétique (2 %) est l'acide tétracosanoïque : 22,3 mg, F. 81,5-82,5°, radioactivité : 3.10^6 c/min/mg.

Incubation des bactéries :

Une souche de *M. smegmatis* provenant de l'Institut Pasteur a été cultivée pendant 10 jours sur 2 litres de milieu de Sauton en présence du sel de potassium de 3 mg d'acide tétracosanoique marqué (9.10^6 c/min).

Isolement et purification des acides α-smegmamycoliques :

Les bactéries, encore humides, ont été traitées par 150 ml de KOH méthanolique à 5 % : on chauffe au reflux pendant 4 h, on acidifie et on sépare l'éthérosoluble : 3,3 g de produits ont été ainsi obtenus. A partir de ce mélange on isole les acides mycoliques bruts (1 g) selon Clermonté et Lederer (2), on estérifie par le diazométhane et on chromatographie sur 30 g de gel de silice : élution avec 50 ml d'éluant pour chaque fraction (voir chromatographie I).

Chromatographie I

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg
1	Ether de pétrole	0
2	Ether de pétrole-benzène 95:5	0
3	" " " " 80:20	0
4	" " " " 70:30	traces
5	" " " " 60:40	7
6	" " " " " "	traces
7	" " " " 50:50	46
8	" " " " " "	38
9	" " " " " "	15
10	" " " " " "	60
11	" " " " 45:55	102
12	" " " " 45:55	120
13	" " " " " "	112
14	" " " " " "	72
15	" " " " " "	56
16	" " " " 40:60	52
17	" " " " 35:65	44
18	" " " " 30:70	40
19	" " " " " "	38
20	" " " " " "	32
21	" " " " " "	17
22	" " " " 20:80	10
23	Benzène	6
24	"	5
25	"	traces
26	Benzène-éther 95:5	"
27	" " 90:10	118
28	" " " "	traces
		Total : 990 mg

Les différentes fractions obtenues ont été examinées par chromatographie sur couche mince. Les fractions 11 à 14 (408 mg) donnent une seule tache dont le Rf est égal à celui des α-smegmamycolates de méthyle ; elles représentent 300 c/min/mg en moyenne (activité totale $1,20\ 10^5$ c/min soit 1,5 % environ de l'activité de l'acide tétracosanoïque introduit dans le milieu de culture). Afin de montrer que cette radioactivité n'est pas due au tétracosanoate de méthyle, nous avons mélangé 380 mg d'α-smegmamycolates de méthyle avec 20 mg de tétracosanoate de méthyle non marqué et nous avons rechromatographié le mélange sur une colonne de 12 g d'acide silicique : élution par 25 ml d'éluant pour chaque fraction (voir chromatographie II).

Chromatographie II

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg
1 et 2	Ether de pétrole 90:10	0
3	Ether de pétrole-benzène 80:20	0
4	" " " " 75-25	0
5	" " " " " "	4
6	" " " " " "	17
7	" " " " " "	94
8	" " " " " "	66
9	" " " " " "	60
10	" " " " " "	60
11	" " " " " "	44
12	" " " " " "	27
13	" " " " 50:50	15
14	Benzène	15
15	Benzène-éther 90:10	2
		Total : 404 mg

Les différentes fractions obtenues ont été chromatographiées sur couche mince ; on constate que le tétracosanoate de méthyle est élué avec les premières fractions de la chromatographie et qu'il n'est pas radioactif. Nous avons vérifié par exemple, par chromatographie en phase vapeur, que la fraction 5 qui ne présente que 4 c/min/mg est bien formée du tétracosanoate de méthyle. Pour la suite des opérations nous avons utilisé le mélange des fractions 8 et 9 dépourvu de tétracosanoate et présentant 300 c/min/mg.

Pyrolyse des α-smegmamycolates de méthyle

60 mg d'α-smegmamycolates de méthyle sont chauffés dans un tube à boules, à 260-280°, sous 0,01 mmHg. On obtient ainsi 15 mg de distillat ayant une activité de 11.400 c/min, soit 760 c/min/mg ; il est constitué du tétracosanoate de méthyle et le résidu, 45 mg, est formé d'aldéhydes méromycoliques bruts ; il a une activité de 4950 c/min. soit 110 c/min/mg.

Décarboxylation de l'acide tétracosanoïque

4,65 mg de l'acide tétracosanoïque radioactif ont été mélangés à 10 mg d'acide tétracosanoïque non marqué et traités avec 20 mg de N_3Na en présence d'un ml de SO_4H_2 concentré à 65-70°, pendant 3 h : le CO_2 dégagé est entraîné par un courant d'azote dans une solution de NaOH. On précipite du CO_3Ba en ajoutant 2 ml d'une solution à 12 % de Cl_2Ba, après avoir ajouté quelques gouttes d'une solution de $ClNH_4$. On centrifuge, on lave le CO_3Ba jusqu'à neutralité et on obtient 8,7 mg de carbonate, activité totale : 3040 c/min.

Le résidu de la réaction est amené à un pH alcalin et l'amine libérée est extraite à l'éther ; on obtient ainsi 10 mg d'amine ayant une activité totale de 368 c/min.

Après isolement de l'amine, on acidifie à nouveau et on isole l'acide tétracosanoïque n'ayant pas réagi. Cet acide présente une activité négligeable (37 c/min.).

B - ORIGINE BIOGENETIQUE DU GROUPEMENT METHYLE

Incubation des bactéries :

M. smegmatis a été cultivé pendant 10 jours sur 2 litres de milieu de Sauton en présence de 40 µC de méthionine – $^{14}CH_3$ ($18,8.10^6$ c/min).

Isolement et purification des acides α-smegmamycoliques :

Les bactéries, encore humides, ont été traitées comme ci-dessus (voir A). On isole une fraction acide (4,28 g). Après estérification par CH_2N_2 on sépare les esters inférieurs et les esters mycoliques selon Clermonté et Lederer. On obtient ainsi 688 mg d'esters mycoliques bruts ayant une activité de 548.10^3 c/min., soit 800 c/min/mg. (2,9 % de la radioactivité introduite dans le milieu de culture). Les esters mycoliques sont purifiés par chromatographie sur gel de silice (voir chromatographie III).

Chromatographie III

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité d'éluant en ml.	Quantité d'éluant en mg.
1 à 7	Ether de pétrole à éther de pétrole-benzène 85:15	100	6
8	" " " " " " 80:20	50	traces
9 à 11	" " " " " " 70:30	100	44
12 à 16	" " " " " " 50:50	130	traces
17 et 18	" " " " " " 40:60	50	58
19 et 20	" " " " " " " "	25	155
21	" " " " " " " "	30	81
22	" " " " " " " "	"	60
23	" " " " " " " "	"	43
24	" " " " " " " "	"	40
25	" " " " " " " "	50	43
26	" " " " " " " "	150	50
27	Benzène-éther 70:30	80	traces
28	" 50:50	20	6
29	Ether	"	85
30	"	50	traces
31	Ether-méthanol 90:10	"	0
32	Ether-ac. acétique 98:2	"	0
			Total : 671 mg

Les fractions 19 à 21, soit 236 mg, donnent à la chromatographie sur couche mince une seule tache dont le Rf est égal à celui d'α-smegmamycolates de méthyle. L'activité totale de l'échantillon est de 314.10^3 C/min. soit 1330 c/min/mg.

Dégradation selon Kuhn-Roth des α-smegmamycolates de méthyle :

Afin de montrer que la radioactivité est localisée dans le groupement méthyle des α-smegmamycolates de méthyle, nous avons soumis des échantillons de 4 à 6 mg de cette substance à l'oxydation sulfochromique selon Kuhn et Roth. L'appareil utilisé est celui décrit par ces auteurs ; un ballon

contenant une solution normale de NaOH est en outre disposé à la sortie du réfrigérant. Ceci permet de capter le CO_2 dégagé (et éventuellement les traces d'acide acétique) et d'avoir ainsi un bilan complet de la radioactivité à la fin de l'oxydation.

L'oxydation est faite de la manière suivante : les échantillons sont d'abord fondus dans le ballon tricol de Kuhn et Roth ; on installe le courant d'azote et on introduit le mélange oxydant (acide sulfurique concentré d = 1,84 : 2 ml et acide chromique 5N : 5 ml) ; on chauffe au reflux pendant 1 h 1/2, puis on enlève le ballon contenant la soude ; son contenu est traité comme il a été décrit précédemment pour la décarboxylation de l'acide tétracosanoïque.

L'acide acétique formé est distillé et neutralisé au fur et à mesure par une solution de NaOH (environ N/100). On arrête la distillation quand le distillat ne présente plus de radioactivité.

Dans une expérience où 3,6 mg d'α-smegmamycolates de méthyle (activité totale 4800 c/min.) ont été utilisés, on a retrouvé 3400 coups dans l'acide acétique obtenu et 1050 coups dans le CO_2. Dans une 2ème expérience, 6,2 mg d'esters ont été oxydés (activité totale : 8200 c/min.). On retrouve 6300 c/min. dans l'acide acétique et 1750 c/min. dans le CO_2. Ainsi (voir tableau II - partie théorique) 75 à 80 % de l'activité des α-smegmamycolates de méthyle se retrouvent dans l'acide acétique provenant de l'oxydation.

Dégradation des α-smegmamycolates de méthyle :

50,7 mg d'α-smegmamycolates de méthyle sont pyrolysés dans un tube à boules. Le tétracosanoate de méthyle (11,3 mg) provenant de la pyrolyse ne présente que 50 c/min/mg d'activité ; les aldéhydes (II) (39 mg) présentent 1550 c/min/mg. Ces aldéhydes sont soumis à l'ozonolyse et les ozonides sont traités directement par Ag_2O en milieu alcalin selon Asinger ; on isole l'éthérosoluble (40,5 mg) ; on traite ensuite le mélange par CH_2N_2 et on chromatographie les esters obtenus sur une colonne de gel de silice. Les fractions susceptibles de contenir l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle (III) sont chromatographiées sur couche mince ; on purifie cet ester par chromatographies successives en utilisant comme témoin le même composé purifié par chromatographie en phase vapeur. On isole ainsi 2 mg de produit que l'on chromatographie ensuite en phase vapeur ; l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle pur, ainsi obtenu, présente 4200 c/min/mg d'activité.

Dégradation selon Kuhn-Roth de l'α-méthyl-eicosanedioate de méthyle :

0,85 mg de cet ester (activité totale 3600 c/min.) sont oxydés en deux fois comme il a été décrit précédemment. On ajoute une goutte d'acide acétique non marqué dans le ballon de réaction ; l'activité totale retrouvée dans l'acide acétique est de 3150 c/min, soit environ 87 % de la radioactivité du produit de départ.

BIBLIOGRAPHIE

(1) F. LYNEN et M. TADA - Angew. Chem. 73, 513 (1961).

(2) R. CLERMONTE et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci. 242, 2600 (1956).

(3) G. LANEELLE - C.R. Acad. Sci, 257, 781 (1963).

(4) K.F. SCHMIDT - Ber., 57. 704 (1924).

(5) E.F. PHARES - Arch. Biochem, 33. 173 (1951).

(6) S.P. COLOWICK et N.O. KAPLAN - Methods in Enzymology, Vol. IV, P. 458.

(7) R. KUHN et H. ROTH - Ber., 66. 1274 (1933).

(8) H. ROTH - in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Vol. II P. 273 (1953). Ed. Georg Thieme, Stuttgart.

(9) F. ASINGER - Ber., 75, 656 (1942).

(10) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Chimie des lipides bactériens, dans Progrès dans la chimie des substances organiques naturelles, 10, 170-271 (1953), Springer, Vienne.

(11) J. PUDLES et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 759 (1954).

(12) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Chemistry and metabolism of bacterial lipides, in Lipide metabolism, K. Bloch, Ed. Wiley and Sons 336-406 (1960).

(13) J. ASSELINEAU - Les lipides bactériens, Hermann, Paris (1962).

(14) E. LEDERER - In Biosynthesis of Lipids, 5th Intern. Congress of Biochemistry, Vol VII, 90-103 (1963) G. Popjak, Ed. Pergamon Press, London.

(15) A.H. ETEMADI et N.P.W. ACHARIA - résultat inédit.

(16) W.J. LENNARZ, W.C. SCHEUERBRANDT et K. BLOCH - J. Biol. Chem. 237, 664 (1962).

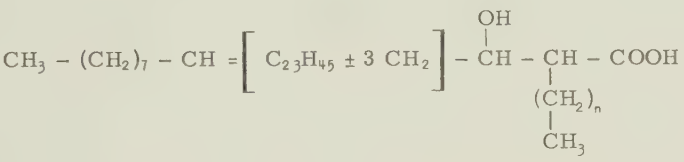
(17) M. GASTAMBIDE-ODIER et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci. 259, 3404 (1964).

(18) S.J. CRISTOL et W.G. FRITZ Jr. - J. Org. Chem., 26, 280 (1961).

CHAPITRE VII

SUR LA STRUCTURE ET LA BIOGENESE DES ACIDES NOCARDIQUES DE NOCARDIA ASTEROIDES

Le premier travail sur les acides nocardiques de *N. asteroïdes* (1) a montré qu'ils possèdent environ 50 atomes de carbone et la structure générale (I).



I

n = 11 ou 13

La partie entre crochets était censée contenir une double liaison et une ramification.

Le poids moléculaire de ces acides étant intermédiaire entre ceux des acides corynomycolique et corynomycolénique à 32 atomes de carbone de Corynébactéries et des acides mycoliques à 80 atomes de carbone environ de Mycobactéries, on a proposé une hypothèse de biogénèse pour les acides nocardiques, hypothèse semblable à celle proposée pour les acides mycoliques et selon laquelle les acides nocardiques seraient formés par la condensation de deux molécules d'acide palmitique et d'une molécule d'acide hexadecen-7-oïque (2) ou plus généralement de trois unités en C_{16} ou de deux molécules en C_{16} et une unité en C_{18} (3).

D'après cette hypothèse la ramification éventuelle des acides nocardiques devait donc se trouver sur le carbone en γ du carboxyle.

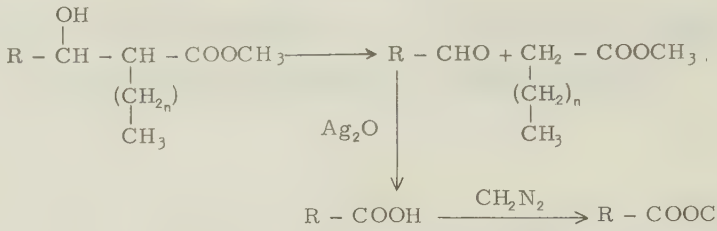
Nous avons d'abord montré que les acides nocardiques de *N. asteroïdes* ne différaient pas seulement par la diversité de l'ester de pyrolyse mais aussi par celle de leur "partie méromycolique" : La chromatographie pyrolytique d'un mélange de ces esters a montré clairement qu'il devait y avoir au moins 4 aldéhydes méronocardiques (voir chapitre II, figure 2) il était alors intéressant de pousser plus loin les investigations.

Nous allons d'abord décrire les résultats qui permettent de proposer les structures IIa et IIb pour les acides nocardiques, et ensuite ceux qui permettent de proposer une voie biogénétique pour ces acides(*).

(*) Pour les techniques d'isolement et de purification, voir la partie expérimentale.

A - STRUCTURE DES ACIDES NOCARDIQUES DE N. ASTEROIDES

Les réactions suivantes ont conduit à l'obtention des méronocardates de méthyle :

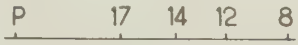


Un échantillon de nocardates de méthyle a été pyrolysé sous le vide d'une trompe à eau. Les esters de pyrolyse ont été examinés par chromatographie en phase vapeur ; deux pics majeurs se trouvent sur le chromatogramme : ceux du myristate et du palmitate de méthyle en plus d'un pic négligeable du laurate de méthyle.

La triangulation des surfaces de ces pics a montré qu'il y avait environ 1/3 de myristate et 2/3 de palmitate de méthyle dans ce mélange.

Le résidu de pyrolyse contenant les méronocardals a été oxydé, selon Asinger (4) par Ag_2O alcalin. Les acides obtenus ont été chromatographiés sur gel de silice.

Les fractions 12 à 17 (voir partie expérimentale, chromatographie II) sont formées d'acides méronocardiques. Leur traitement par CH_2N_2 suivi de chromatographie sur couche mince d'acide silicique a permis de constater (voir figure 1) que le Rf des esters obtenus était plus grand que celui du palmitate de méthyle utilisé comme témoin.



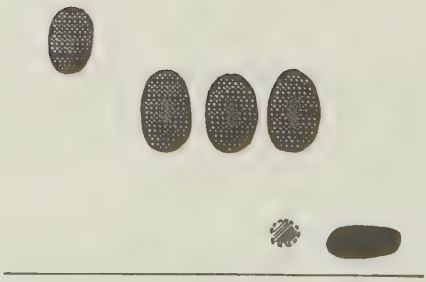


Figure 1 : Chromatoplaque des esters méthyliques de certaines fractions de la chromatographie des acides méronocardiques ; les chiffres (8, 12, 14 et 17) indiquent les numéros des fractions de la chromatographie des acides méronocardiques (chromatographie II) et P = palmitate de méthyle témoin.

Un échantillon de ces esters est examiné par la spectrométrie de R. M. N. En comparant la surface du singulet à 217 cps, attribuable aux trois protons des groupements méthyle ester, à celle des signaux de groupement méthyle de type $CH_3 - (CH_2)_n \ldots$ centré à 55 cps, on constate que la surface de ces pics est pratiquement identique. Les méronocardates pouvaient donc consister en de longues chaînes non ramifiées. Par ailleurs, l'existence d'un triplet à 313-323 cps indique la nature insaturée de ces esters.

L'hydrogénation catalytique d'un échantillon de méronocardates de méthyle en présence de PtO_2 aboutit à un produit : F = 78-81° (remarquer le haut point de fusion de ce mélange d'esters) que l'on soumet à la spectrométrie de masse. L'étude du spectre a montré que nous étions en présence d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras normaux à nombre pair d'atomes de carbone de C_{30} à C_{40}.

Les pics les plus importants correspondent à des acides normaux en C_{32}, C_{34}, C_{36} et C_{38}. Les pics correspondant à des acides impairs existent également mais sont de très faible intensité. Un pic important à m/e = 74 indique qu'il n'y a pas de ramification en α du carboxyle. Des pics existent sur le spectre dont les valeurs de masse correspondent à $(CH_2)_m - \overset{\overset{O}{\|}}{C} - OCH_3$ et notamment celui, le plus important de cette série, à m/e = 143 dû à l'ion $(CH_2)_6 - \overset{\overset{O}{\|}}{C} - OCH_3$ (5, 6).

On ne trouve pas de pic indiquant l'existence d'une ramification dans la chaîne hydrocarbonée. On peut donc écrire la formule suivante pour les acides perhydronocardiques(*).

$$CH_3 - (CH_2)_m - \overset{\overset{OH}{|}}{CH} - \underset{\underset{(CH_2)_n}{|}}{CH} - COOH$$
$$\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \underset{\underset{CH_3}{|}}{(CH_2)_n}$$

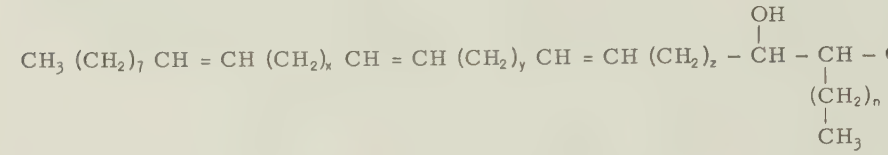
m = 28, 30, 32, 34, 36, 38

n = 11, 13.

Nombre de doubles liaisons dans les acides nocardiques : Un échantillon de méronocardates de méthyle a été soumis à la spectrométrie de masse. L'examen des pics moléculaires a permis de constater l'existence de deux types d'acides méronocardiques : des pics existent sur le spectre à m/e = 546, 574 et 602. Ce sont les pics moléculaires des méronocardates doublement insaturés. Une autre série de pics correspond à m/e = 460, 488, 516, 544 et 600 ; il s'agit des pics moléculaires d'esters triplement insaturés ; ces interprétations sont confirmées par la spectrométrie de masse des méronocardates de méthyle hydrogénés. Tous les pics mentionnés font place à des pics à m/e = 466, 494, 522, 550, 578 et 606.

(*) Nous remercions le Dr. R. Ryhage d'avoir étudié ce spectre et confirmé les interprétations ci-dessus.

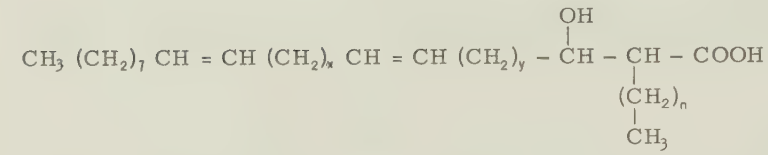
Ces résultats permettent d'écrire les formules IIa et IIb pour les acides nocardiques de *N. asteroïdes*.



IIa

$x + y + z = 15,\ 17,\ 19,\ 21$

$n = 11,\ 13.$



IIb

$x + y = 25,\ 27,\ 29$

$n = 11,\ 13$

B - BIOGENESE DES ACIDES NOCARDIQUES DE N. ASTEROIDES

La culture de *N. asteroïdes* dans 1 litre de milieu de Santon en présence de 15 µC d'acide palmitique 1 - ^{14}C (activité totale $5,17 \cdot 10^6$ c/min(*) fournit un mélange d'acides nocardiques radioactifs présentant 250 c/min/mg (voir partie expérimentale).

La pyrolyse des nocardates de méthyle fournit un mélange de myristate et de palmitate dans les proportions 1 : 2 ; ce mélange est radioactif. Il présente 300 c/min/mg. On purifie alors le palmitate de méthyle par chromatographie en phase vapeur. Ce palmitate présente 450 c/min/mg. Les méronocardates de méthyle, préparés et purifiés comme ci-dessus (voir partie A), présentent une activité de 200 c/min/mg. Les résultats de mesure de la radioactivité sont résumés dans le tableau I.

La décarboxylation selon Schmidt et Phares (7, 8) d'un échantillon de 8,7 mg d'esters de pyrolyse (mélange de palmitate et de myristate de méthyle) ; activité totale 2.600 c/min a fourni 12,5 mg de CO_3Ba présentant 2.300 c/min et 7,5 mg d'une amine ne présentant que 13 c/min/mg. Les résultats de mesure de la radioactivité sont résumés dans le tableau II.

(*) Les mesures de la radioactivité ont été effectuées sur un appareil Nulcear Chicago Gas Flow Counter donnant environ 20 % de la radioactivité réelle.

Tableau I

Résumé des résultats de mesure de la radioactivité, activité donnée en c/min/mg.

Echantillon examiné.	Nocardates de méthyle	Méronocardates de méthyle	Myristate de méthyle	Palmitate de méthyle
Activité en c/min/mg	250	200	négligeable	450

Tableau II

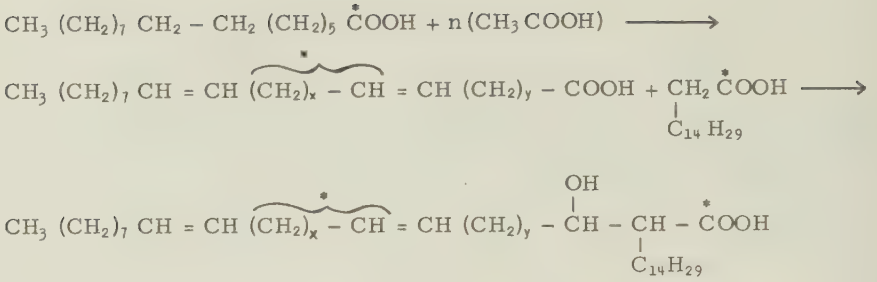
Résumé des résultats de mesure de la radioactivité, activité donnée en c/min/mg.

Echantillon examiné.	Mélange d'esters de pyrolyse	Palmitate de pyrolyse	Amine	CO^2
Activité en c/min/mg	300	450	13	2.440

Les résultats de la décarboxylation montrent que dans les molécules de l'acide nocardique qui donnent par pyrolyse de l'acide palmitique, les carbones 1 et 2 et la ramification en α trouvent leur origine biogénétique dans l'acide palmitique ; il est plus que probable que pour les homologues inférieurs d'acide nocardique, qui donnent par pyrolyse de l'acide myristique, c'est cet acide qui est à l'origine des carbones 1 et 2 et de la ramification en α.

La radioactivité des acides méronocardiques est du même ordre de grandeur que celle du palmitate obtenu par pyrolyse ; l'absence de radioactivité dans le myristate obtenu par pyrolyse et l'activité négligeable de pentadecylamine montrent qu'il n'y a pas eu de catabolisme notable du palmitate radioactif ajouté au milieu de culture. La radioactivité de la partie méronocardique doit donc probablement être localisée dans un seul carbone. Un simple calcul montre que si le carbone du carboxyle de l'acide palmitique présente 10.000 c/min/mg, la radioactivité du méronocardate ramenée à 1 mg d'un carbone est de 8.600 c/min. Ceci est un bon accord si l'on tient compte des erreurs expérimentales et du fait que des voies secondaires de biogénèse peuvent se greffer sur un processus dominant.

On peut donc proposer le schéma de biogénèse suivant pour les acides nocardiques : une molécule d'acide palmitique sert d'initiateur ; par condensation avec des unités acétiques et après désaturation, elle est transformée en acide méronocardique ; celui-ci se condense ensuite par "condensation mycolique" avec une deuxième molécule d'acide palmitique.



Biosynthèse d'un acide nocardique.

Le fait que l'acide palmitique semble servir d'initiateur dans ce cas est à noter. Il serait d'ailleurs intéressant de tester d'autres acides gras inférieurs et notamment l'acide stéarique et surtout l'acide oléïque.

La possibilité de l'utilisation des acides gras inférieurs pour la génèse des acides gras plus lourds a déjà été rapportée.

Dans le cas des lipides du cerveau du rat, Bernhard et Pedersen (10) et Hajra et Radin (11), par l'étude de la biogénèse des acides gras jusqu'à 24 atomes de carbone, sont arrivés à la conclusion que l'allongement de chaîne à partir de l'acide palmitique avait lieu. De même Fulco et Mead (12) ont montré que l'acide nervonique provient de l'allongement de chaine à partir de l'acide oléïque.

Récemment, O' Brien (13), par une étude comparée des acides gras de la substance blanche du lobe frontal des patients atteints de leucodystrophie metachromatique et de l'individu normal, a constaté que les cérébrosides et les sphingomyélines des patients contenaient 7 à 10 fois moins d'acides gras supérieurs (C_{21} à C_{26} atomes de carbone). Ces mêmes acides gras se trouvent également en très faible proportion dans les céramides.

La pathogénie de la maladie est expliquée sur la base de la déficience de l'équipement enzymatique capable de catalyser l'élongation de la chaîne à partir de l'acide palmitique pour conduire aux acides supérieurs, acides qui seraient nécessaires pour la cohésion de la gaine de méyline (voir aussi 14).

PARTIE EXPERIMENTALE

Culture des bactéries :

Nous avons utilisé la souche n° 9969 de *Nocardia asteroïdes* cultivée sur un litre de milieu de Sauton pendant 35 jours en présence de 15 µC d'acide palmitique 1 - ^{14}C (activité totale 5,7 - 10^6 c/min).

Isolement et purification des acides nocardiques :

Les bactéries ont été filtrées et traitées, encore humides, par la potasse méthanolique, comme décrit précédemment (voir chapitre VI).

Les acides obtenus ont été traités par le diazométhane et le mélange d'esters (1,5 g) chromatographié sur gel de silice. Les fractions éluées par

le benzène (173 mg), donnent une seule tache à la chromatographie sur couche mince selon Lanéelle (15) : leur Rf est égal à celui d'un échantillon de nocardates de méthyle authentique. Ces esters sont radioactifs : activité totale 43.300 c/min (0,8 % de l'activité introduite dans le milieu de culture), soit 250 c/min/mg. Afin de montrer que cette radioactivité n'est pas due à une contamination par le palmitate de méthyle, nous avons mélangé 160 mg de nocardates de méthyle radioactifs avec 26 mg de palmitate de méthyle non radioactifs et rechromatographié le mélange sur 5 g de gel de silice (voir chromatographie I). On utilise 10 ml d'éluant pour chaque élution.

Chromatographie I

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité en mg
1	Ether de pétrole	0
2	Ether de pétrole-benzène 90:10	0
3	" " " " 80:20	traces
4	" " " " 70:30	17
5	" " " " 60:40	9
6	" " " " 50:50	traces
7	" " " " 20:80	55
8	" " " " " "	40
9	" " " " " "	27
10	" " " " " "	12
11	" " " " " "	5
12	" " " " " "	4
13	" " " " " "	3
14	" " " " " "	2
15	Ether	4
16	"	4
17	"	0
18	"	0
		Total : 182 mg

Les fractions 4 et 5 ne présentent pas de radioactivité notable (2c/min/mg). La chromatographie en phase vapeur montre qu'il s'agit de palmitate de méthyle. Les fractions 7 à 12 sont réunies ; activité : 250 c/min/mg. Ce mélange est utilisé pour les expériences suivantes.

Pyrolyse des nocardates de méthyle :

Un échantillon de nocardates de méthyle (79 mg, activité totale 19.750 c/min) a été pyrolysé dans un tube à boules sous le vide d'une trompe à eau. La pyrolyse se fait à 260°-280° et les esters provenant de la pyrolyse sont recueillis au fur et à mesure de la pyrolyse. On obtient 21,6 mg d'esters présentant 6400 c/min soit 300 c/min/mg. Le résidu contient les aldéhydes méronocardiques bruts, 56,4 mg, présentant 11.600 c/min soit 200 c/min/mg.

Purification du palmitate de méthyle provenant de la pyrolyse :

Les esters provenant de la pyrolyse sont chromatographiés en phase vapeur ; l'appareil utilisé est le F. et M. n° 500 muni d'un catharomètre. On utilise une colonne de silicone DC 550 à 5 % de 3 m de long et de 4 mm de diamètre intérieur. Le chromosorb est utilisé comme support ; le gaz vecteur est l'hélium (4,5 l/h) : on constate qu'à part un pic négligeable de

laurate de méthyle, il y a 2 pics sur le chromatogramme : ceux du myristate et du palmitate de méthyle. La triangulation des surfaces de ces pics permet de constater que le myristate constitue 1/3 du mélange et le palmitate les 2/3 ; par ailleurs le myristate n'est pas radioactif, toute la radioactivité se trouve dans le palmitate qui a une activité de 450 c/min/mg.

Décarboxylation des esters de pyrolyse :

Ayant auparavant montré que toute la radioactivité de la fraction distillable obtenue par pyrolyse se trouvait dans le palmitate, nous avons soumis un échantillon de 8,7 mg du mélange d'esters de pyrolyse (activité : 2600 c/min) à la décarboxylation selon Schmidt. On obtient 12,5 mg de CO_3Ba présentant une activité de 2300 c/min. L'amine isolée (7,5 mg) sans d'autre purification ne présente que 12 c/min/mg.

Préparation des méronocardates de méthyle :

Les aldéhydes méronocardiques bruts, résidus de la pyrolyse des nocardates de méthyle, sont oxydés en acides méronocardiques selon Asinger : 56 mg d'aldéhydes bruts, dissous dans l'éther, ont été introduits en petites portions dans une suspension fraichement préparée d'Ag_2O et maintenus à 85°. La suspension est préparée comme suit : on ajoute 400 mg de NO_3Ag à 5 ml d'une solution à 10 % de NaOH. On agite fortement pendant une dizaine de minutes à 85°. Après l'introduction des aldéhydes on maintient le chauffage et l'agitation pendant 3 heures : on laisse refroidir. On introduit de l'éther et on acidifie par une solution de NO_3H diluée. L'acide méronocardique brut se trouve alors dans l'étherosoluble. Après le traitement habituel on isole 52 mg de produit que l'on chromatographie sur 1,5 de gel de silice. L'élution se fait avec 3 ml d'éluant pour chaque fraction (voir chromatographie II).

Chromatographie II

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité de produit en mg.
1 et 2	Ether de pétrole	4
3	Ether de pétrole-benzène 90:10	traces
4	" " " " 80:20	traces
5	" " " " 70:30	4
6	" " " " 60:40	3
7	" " " " 50:50	traces
8	" " " " 40:60	1
9	" " " " " "	4
10	" " " " 30:70	3
11	" " " " 20:80	3
12	Benzène	4
13	Benzène-éther 90:10	3
14	" " " "	3
15	" " " "	4
16	" " " "	7
17	" " " "	2
18 à 21	" " 80:20 à 50:50	2
22	" " 50:50	1
23	Ether	1
		Total : 49 mg

Les fractions 12 à 17 sont chromatographiées sur une plaque de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur en éluant avec un mélange éther de pétrole-éther (95-5). Ces fractions ne migrent pas (taches allongées sur le point de départ). On les traite au diazométhane et on rechromatographie dans les mêmes conditions. La plaque présente alors l'aspect rapporté dans la figure 1.

Les fractions 13 à 16 sont réunies - activité : 200 c/min/mg. Spectre I. R. : bande C = O à 1745 cm^{-1}. Pas de bande OH. Spectre de R. M. N. : triplet à 313-323 cps. Singulet à 217 cps et triplet à 55 cps. Spectre de masse (appareil : Atlas CH_4) : pics moléculaires à m/e = 460, 488, 516, 544, 546, 574, 600 et 602.

Hydrogénation catalytique des méronocardates de méthyle :

13 mg de méronocardates de méthyle dissous dans 3 ml d'acétate d'éthyle sont additionnés de 10 mg de PtO_2 et agités en présence d'hydrogène jusqu'à la fin de l'absorption ; on filtre sur verre fritté et on rince abondamment au chloroforme. Après évaporation on obtient 12 mg d'un solide qui présente sans d'autre purification : F = 78-81°.

Un échantillon de ce produit est soumis à la spectrométrie de masse : pics moléculaires à m/e = 466, 494, 522, 550, 578, 606.

BIBLIOGRAPHIE

(1) G. MICHEL, C. BORDET et E. LEDERER - C.R. Acad. Sci. 250, 3518 (1960).

(2) J. ASSELINEAU - Les lipides bactériens. Hermann, Paris (1962).

(3) E. LEDERER - VIIème Corso Estivo di Chimica, Milano 1962, Academia Nationale del Lincei, Roma, 159-179, 1964.

(4) F. ASINGER - Ber., 75. 656 (1942).

(5) R. RYHAGE et E. STENHAGEN - Arkiv Kemi. 13, 523 (1959).

(6) R. RYHAGE et E. STENHAGEN - J. Lipid Research, 1, 523 (1960).

(7) K.F. SCHMIDT - Ber. 57, 704 (1924).

(8) E.F. PHARES - Arch. Biochem. 33, 173 (1951).

(9) S.P. COLOWICK et N.O. KAPLAN - Methods in enzymology, IV, 458 (1957).

(10) K. BERNHARD et W. PEDERSEN - Helv. 46, 2363 (1963).

(11) A.K. HAJRA et N.S. RADIN - J. Lip. Res. 4, 270 (1963).

(12) A.J. FULCO et J.F. MEAD - J. Biol. Chem. 236, 2416 (1961).

(13) J.S. O' BRIEN - Biochem. Biophys. Res. Comm 15, 484 (1964).

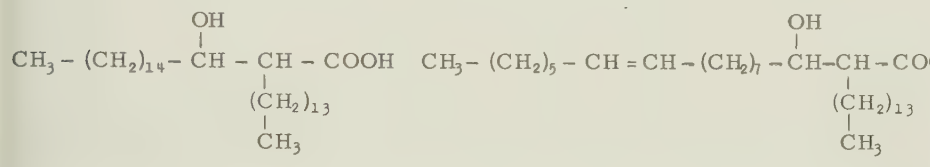
(14) L. SVENNERHOLM - Brain Lipids and Lipoproteins and the Leucodystrophies, J. FOLCH-PI et H.J. BAUER - Ed. Elsevier Pub. Co. Ltd. New York (1963).

(15) G. LANEELLE - C.R. Acad. Sci. 257, 781 (1963).

CHAPITRE VIII

RECHERCHE DES ACIDES α-RAMIFIÉS, β-HYDROXYLES DANS QUELQUES ESPECES DE CORYNEBACTERIES

Deux acides α-ramifiés, β-hydroxylés en C_{32} ont été isolés des lipides de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Corynebacterium ovis* (1, 2, 3) : l'acide corynomycolique (I) et l'acide corynomycolénique (II) :



I

II

On s'est alors demandé (4, 5) si ces acides n'étaient pas présents chez toutes les Corynébactéries. Les renseignements sur les acides α-ramifiés, β-hydroxylés des Corynébactéries se limitant alors à deux espèces, de ce genre bactérien ; il nous a paru intéressant d'en examiner d'autres. Notre étude a porté sur quelques espèces aérobies et une espèce anaérobie de Corynébactéries.

I - IDENTIFICATION DES ACIDES α-RAMIFIES, β-HYDROXYLES DANS LES LIPIDES DE QUELQUES ESPECES DE CORYNEBACTERIES AEROBIES

a) Mise en évidence d'homologues d'acides corynomycoliques et corynomycoléniques dans les lipides de *Corynebacterium 506*.

Isolement des acides :

Les bactéries (*Corynebacterium* 506) ensemencées sur 20 boîtes de Roux et cultivées pendant 8 jours sur le milieu V.F. glucosé à 2 ‰, sont centrifugées et le culot est directement soumis au traitement par la potasse méthanolique. On isole une fraction acide et une fraction "neutre". Les acides hydroxylés que nous décrivons ici ont été isolés de la fraction "neutre", les sels de potassium de ces acides étant solubles dans l'éther (3).

La fraction "neutre", a été chromatographiée d'abord sur gel de silice ; les fractions acides ont été ensuite traitées par le diazométhane. On isole les esters hydroxylés par chromatographie sur plaque préparative. Le mélange obtenu est semi-liquide, $[\alpha]_D = + 5,6°$.

Le spectre I.R. présente des bandes à 1728 et 1745 cm^{-1}. Le spectre de R.M.N. présente un triplet à 312-322 cps, montrant l'existence d'insaturation.

Chromatographie pyrolytique

La pyrolyse d'un échantillon du mélange fournit une fraction distillant jusqu'à 290° sous le vide d'une trompe à eau. On chromatographie cette fraction en phase vapeur sur une colonne de polyester (succinate de butanediol) et une colonne de silicone. Sept pics sont observés dans chaque cas (voir figure 1 A et B). Les pics 1, 3 et 6 sont formés, d'après leur temps de rétention, de myristate, de palmitate et de stéarate de méthyle (cochromatographie sur les deux colonnes avec des témoins connus).

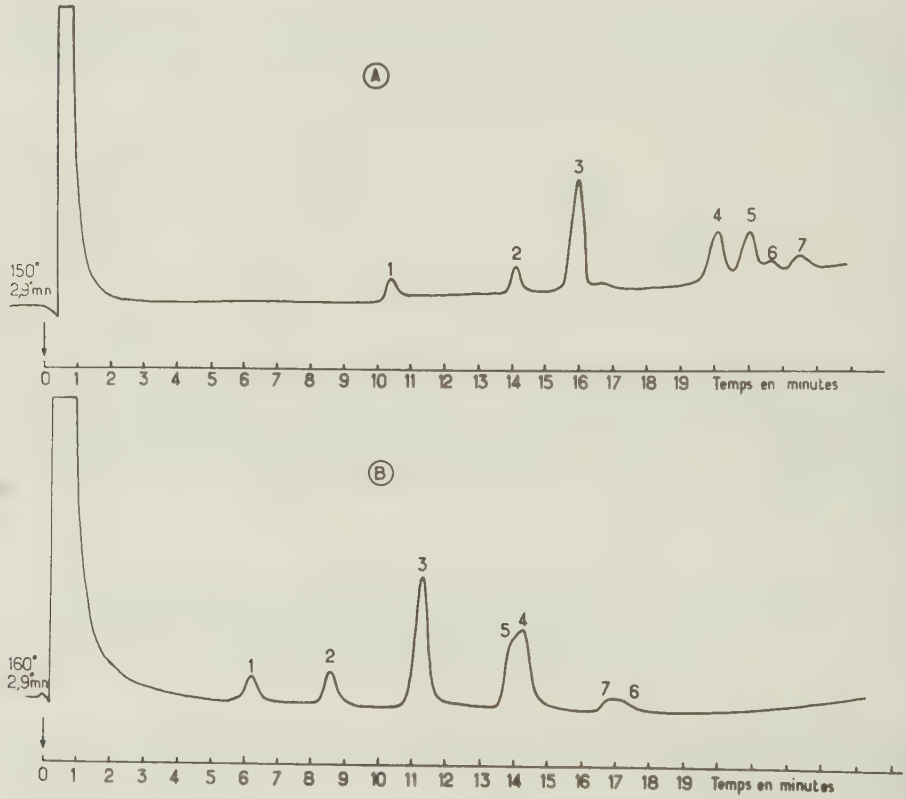


Figure 1 - A - Chromatographie des produits de pyrolyse du mélange d'esters mycoliques de *Corynebacterium* 506 sur une colonne de succinate de butanediol : 1 = myristate, 3 = palmitate, 6 = stéarate, 2, 4 et 5 = aldéhydes provenant de la pyrolyse, 7 = oléate.

B - Chromatographie du même mélange sur une colonne de silicone DC 550. La signification des chiffres est la même que ci-dessus.

Les pics 2, 4 et 5 pouvaient correspondre à ceux d'aldéhydes de pyrolyse (respectivement aldéhyde palmitique, stéarique et un aldéhyde en C_{18} insaturé). On sait en effet que les esters α-ramifiés, β-hydroxylés se pyrolysent selon le schéma suivant (voir réf. 6 et le chapitre II).

$$R_2 - \underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}} - \underset{\displaystyle R_1}{\underset{|}{CH}} - COOCH_3 \xrightarrow{\Delta} R_2CHO + R_1 - CH_2 - COOCH_3$$

Oxydation

Pour vérifier cette supposition, nous avons soumis le mélange de produits de pyrolyse à l'oxydation par Ag_2O alcalin selon Asinger (7). On traite les produits obtenus avec le diazométhane et on chromatographie ensuite en phase vapeur, soit sur une colonne de silicone, soit sur une colonne de polyester ; on observe 7 pics (voir figure 2 C et D) :

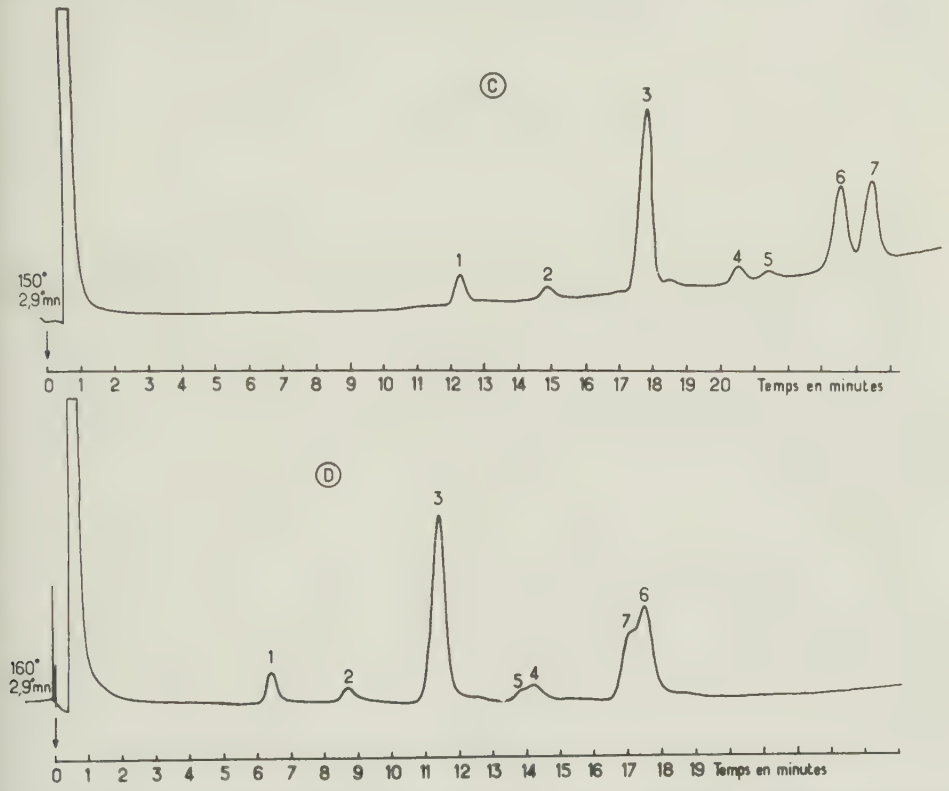


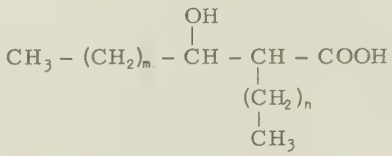
Figure 2 - C - Chromatographie des produits de pyrolyse oxydés et traités au CH_2N_2 sur une colonne de succinate de butanediol : 1 = myristate, 3 = palmitate, 6 = stéarate, 2, 4 et 5 = aldéhydes n'ayant pas réagi, 7 = un ester en C_{18} monoinsaturé (oléate ?).

D - Chromatographie du même mélange sur une colonne de silicone DC 550. La signification des chiffres est la mêmes que ci-dessus.

Les pics 1, 3 et 6, d'après leur temps de rétention (cochromatographie sur les deux colonnes avec les produits connus), sont ceux du myristate, du palmitate et du stéarate de méthyle. Les pics 2, 4 et 5 sont attribuables aux aldéhydes n'ayant pas réagi. Le pic 7, d'après son comportement sur la colonne de polyester, peut être un ester en C_{18} monoinsaturé. On récupère ce

produit par chromatographie en phase vapeur et on en fait le spectre de masse. Le pic moléculaire de ce produit se trouve à m/e = 296 (pic moléculaire d'un ester en C_{18} monoinsaturé). Un pic important à m/e = 264 = M-32 est également observé sur le spectre, ainsi qu'un pic à m/e = 222 = M-74 et un pic à m/e = 180 = M-116. Ces faits indiquent qu'il s'agit d'un ester monoinsaturé en C_{18} (8). D'après l'importance relative des pics 3, 6 et 7 sur le chromatogramme des produits oxydés et traités au diazométhane, il est clair que les pics 2, 4 et 5 des chromatogrammes des produits de pyrolyse étaient bien dûs à des aldéhydes.

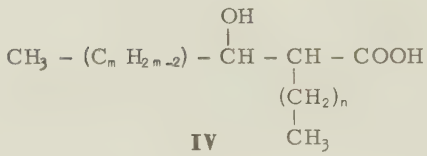
Les résultats mentionnés ici permettent d'écrire les formules (III) et (IV) pour les acides α-ramifiés, β-hydroxylés de *Corynebacterium* 506 ; les deux représentants les plus importants de ce mélange ont les structures (V) et (VI) :



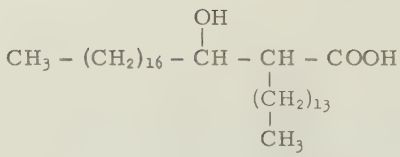
m = 14, 16

m = 11, 13 et 15

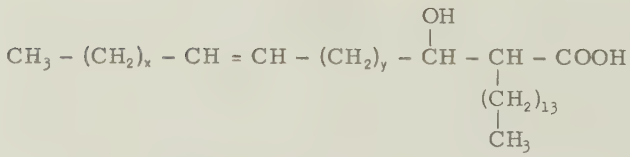
III



IV



V $(C_{34}H_{68}O_3)$



VI $(C_{34}H_{66}O_3)$

$x + y = 14$

Spectrométrie de masse

Le spectre des esters α-ramifiés, β-hydroxylés isolés de *Corynebactérium* 506, effectué sur un appareil Atlas CH_4(*), montre les pics moléculaires des esters de pyrolyse à m/e = 270 (le plus important), 298 et 242 (palmitate, stéarate et myristate). On observe un pic à m/e = 266 pic moléculaire d'aldéhyde en C_{18} monoinsaturé. Le pic moléculaire d'aldéhyde stéarique est absent. Par contre, on observe des pics à m/e = 250 (M-18 d'aldéhyde stéarique), 248 (M-18 pour un aldéhyde en C_{18} monoinsaturé). L'existence des pics d'esters et d'aldéhydes s'explique par la pyrolyse des mycolates examinés.

Dans la région des pics de masse les plus élevées, on observe un pic à m/e = 520 correspondant à M-18 pour le composé (V) et un deuxième pic à m/e = 518 correspondant à M-18 pour le composé (VI). On observe également un pic à m/e = 492, qui correspond à M-18 pour l'acide corynomycolique qui existe en faible proportion dans le mélange.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la chromatographie pyrolytique.

b) Mise en évidence des acides α-ramifiés, β-hydroxylés dans *Corynebacterium* 6083-9.

Ces bactéries ont été cultivées sur le milieu V-F glucosé, filtrées et traitées avec la potasse méthanolique ; on isole les acides α-ramifiés, β-hydroxylés de la fraction neutre, comme il a été décrit plus haut. Les esters méthyliques correspondants ont le même Rf que le corynomycolate de méthyle utilisé comme témoin. Le spectre I.R. de ces produits présente des bandes vers 1727 cm^{-1} et 1746 cm^{-1}, leurs spectres de R.M.N. présentent des signaux centrés à 315 cps montrant l'existence d'insaturation. Un échantillon de ces esters a été pyrolysé dans un tube à boules et on a isolé la fraction qui distille jusqu'à 280° sous 0,01 mm Hg ; la chromatographie en phase vapeur de cette fraction a montré des pics dont les temps de rétention, en utilisant les deux colonnes polaire et apolaire, correspondent à ceux des esters en C_{14}, C_{16}, C_{18} et C_{18} insaturé ; on reconnaît également les pics des aldéhydes en C_{16} et C_{18} ; des pics dont les temps de rétention correspondent à ceux d'esters à nombre impair d'atomes de carbone en C_{15} et en C_{17} existent également ainsi que des pics d'aldéhydes en C_{15} et C_{17}. Les pics les plus importants sont ceux du stéarate et de l'aldéhyde en C_{18}. On oxyde un échantillon de ce mélange par Ag_2O alcalin, et après estérification par le diazométhane on chromatographie sur les deux mêmes colonnes. On trouve alors les pics d'esters saturés de C_{14} à C_{18} avec un pic correspondant à celui d'un ester monoinsaturé en C_{18}. Le plus important des pics d'esters est celui du stéarate. L'existence d'un ester en C_{18} monoinsaturé dans les produits de pyrolyse est surprenante, c'est en effet la première fois qu'on isole un acide α-ramifié, β-hydroxylé, portant une insaturation dans la ramification en α. Pour montrer qu'il s'agit réellement d'un ester monoinsaturé en C_{18} nous avons recueilli, par chromatographie en phase vapeur du pyrolysat non oxydé, assez de produit pour effectuer une spectrométrie de masse. Le spectre obtenu montre un pic moléculaire à m/e = 296, un pic à m/e = 264 = M-32, un pic

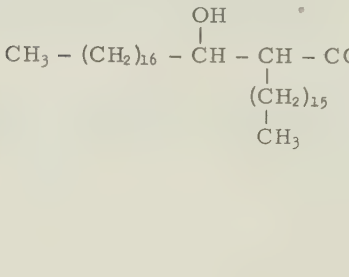
---

(*) Nous remercions le Dr. Das d'avoir effectué cette mesure.

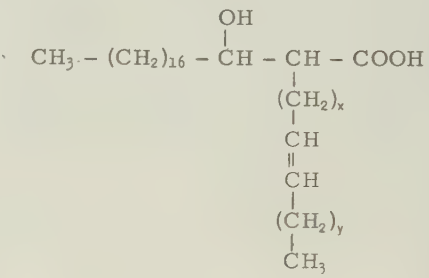
à m/e = 222 = M-74 et un pic à m/e = 180 = M-116, ce qui, comme nous l'avons vu, est en accord avec le spectre d'un ester en C_{18} monoinsaturé.

D'après les données rapportées ici on peut proposer la structure générale III pour les acides α-ramifiés, β-hydroxylés de *Corynebacterium* 6083-9 avec m = 13 à 17 et n = 11 à 15.

Le constituant majeur du mélange a la structure VII



VII ($C_{36}H_{72}O_3$)



VIII ($C_{36}H_{70}O_3$)

x + y = 13

La spectrométrie de masse des esters méthyliques d'acides α-ramifiés, β-hydroxylés de *Corynebacterium* 6083-9 en utilisant un système d'introduction directe a permis de vérifier que le composé VII est le constituant prépondérant du mélange. L'étude de la région des pics de masses les plus élevées a montré en effet un pic important à m/e = 548 = M-18 pour cet ester méthylique ; par ailleurs un pic à m/e = 546 = M-18 pour l'ester méthylique du composé VIII existe également. Compte tenu de l'analyse du mélange d'esters et d'aldéhydes provenant de la pyrolyse le pic à 546 ne peut avoir d'autres attributions.

c) Isolement des acides α-ramifiés, β-hydroxylés à partir des lipides de *Corynebacterium rubrum*.

Par des techniques identiques à celles que nous avons rapportées, un mélange d'acides α-ramifiés, β-hydroxylés a été isolé à partir du *C. rubrum*. L'étude complète de structure de ces acides n'est pas encore effectuée. Néanmoins nous savons que la pyrolyse de leur ester méthylique donne les esters en C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15} et C_{16} ; les aldéhydes semblent être formés d'un mélange complexe de composés saturés et insaturés, à nombre pair et impair d'atomes de carbone s'échelonnant de C_{17} à C_{30}. L'étude de ces composés se poursuit. L'existence dans les acides et les aldéhydes de pyrolyse des termes à nombre impair d'atomes de carbone est un fait nouveau. Nous l'avons également noté à propos des acides α-ramifiés, β-hydroxylés isolés de *Corynebacterium 6083-9* mais là ils sont en très faible proportion.

Il est à remarquer que les acides à nombre impair d'atomes de carbone, notamment en C_{15} et en C_{17} (saturé et insaturé pour l'acide en C_{17}) existent dans les lipides de *C. rubrum*, et dans une expérience où nous avons introduit de l'acide propionique 3 - ^{14}C dans le milieu de culture, nous avons constaté que ces acides impairs, ainsi que la fraction d'acides α-ramifiés, β-hydroxylés étaient radioactifs. L'acide propionique semble servir d'initiateur dans

la biogénèse de ces acides impairs ainsi que dans celle des acides α-ramifiés, β-hydroxylés qui, soit dans la ramification en α, soit dans le fragment méromycolique, comportent des termes impairs.

En conclusion, la présence des acides α-ramifiés, β-hydroxylés dans les lipides des Corynébactéries aérobies semble donc assez générale. La nature de ces acides est assez variable. *Corynebacterium 506* synthétise des homologues en C_{34} des acides corynomycoliques et corynomycoléniques ; *Corynebacterium 6083-9* fabrique des homologues encore plus lourds, en C_{36}, saturé et insaturé ; le terme insaturé comporte une double liaison dans la ramification en α. *Corynebacterium rubrum* semble synthétiser des acides α-ramifiés, β-hydrolysés d'une grande variabilité comportant des acides de type corynomycolique jusqu'aux acides de type nocardique. Mais on constatera que dans la majeure partie des cas étudiés jusqu'à présent la biogénèse des acides α-ramifiés, β-hydroxylés quantitativement dominant des Corynebactéries s'explique par la condensation soit de deux unités en C_{16}, soit d'une unité en C_{16} et d'une unité en C_{18}, soit de deux unités d'acide gras en C_{18}.

II - ETUDE DES LIPIDES D'UNE ESPECE ANAEROBIE DE CORYNEBACTERIES :

ISOLEMENT DES ACIDES ISOPENTADECANOIQUE ET ISOHEPTADECANOIQUE DES LIPIDES DE *CORYNEBACTERIUM PARVUM*

Les lipides de *C. parvum* (936B) ont d'abord été extraits à l'acétone, ensuite à l'alcool-éther et enfin au chloroforme (voir partie expérimentale). Dans ces extraits nous n'avons pas trouvé d'acide α-ramifié, β-hydroxylé.

A - Etude de l'extrait acétonique

Cet extrait est séparé en fractions acide et neutre.

1/ Identification des acides isopentadécanoique et isoheptadécanoïque dans la fraction acide : le titrage de la fraction acide brute donne un poids moléculaire moyen de 268 ; après estérification par le diazométhane et séparation en acides saturés et insaturés (9), on distille la fraction d'esters saturés dans un tube à boules ; on constate ainsi que presque tout le produit distille au-dessous de 150° sous 0,01 mmHg, ce qui, joint au comportement chromatographique de cette fraction (voir chromatographie II), permet de conclure qu'il n'y a pas d'acides du type corynomycolique dans cette fraction.

La chromatographie en phase vapeur d'un échantillon d'esters saturés sur une colonne de silicone à 5 p. 100 (voir figure 3) donne 6 pics.

Nous avons identifié les esters donnant les pics 1, 3, 4 et 6 par leur temps de rétention : il s'agit de myristate, pentadécanoate, palmitate et heptadécanoate de méthyle. Par chromatographie préparative, nous avons isolé les esters donnant les pics 2 et 5 : il s'agit de liquides incolores, ne déviant pas le plan de polarisation de la lumière polarisée.

La spectrométrie de masse donne les pics moléculaires à m/e = 256 et m/e = 284. Il s'agit donc de pentadécanoate et de heptadécanoate de méthyle

ramifiés : on sait que le temps de rétention des esters ramifiés est inférieur à celui des esters à chaine linéaire.

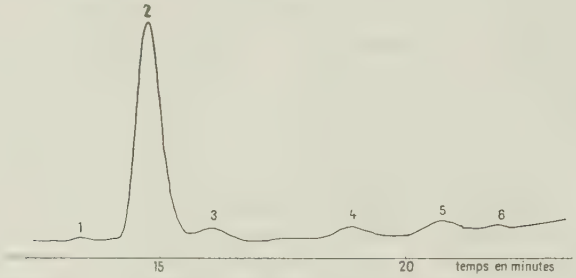
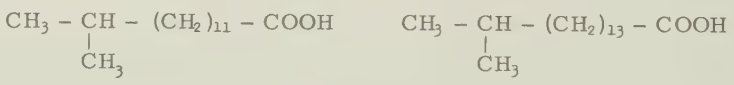


Figure 3 - Chromatographie en phase vapeur des esters méthyliques des acides gras saturés de l'extrait acétonique de *C. parvum* : 1 = myristate, 2 = isopentadécanoate, 3 = pentadécanoate, 4 = palmitate, 5 = isoheptadécanoate, 6 = heptadécanoate.

Par saponification des esters méthyliques on obtient les acides correspondants : F = 49-50,5° (littérature : 50-51° pour l'acide isopentadécanoïque) (10) et 57-58,5° (littérature : 61-61,6° pour l'acide isoheptadécanoïque (11), respectivement. L'analyse est en bon accord avec les formules $C_{15}H_{30}O_2$ et $C_{17}H_{34}O_2$.

Les spectres I. R. présentent la double bande de vibration de déformation à 1382 et 1363 cm^{-1} caractéristique d'un groupement gem-diméthyle (12). La présence d'une bande d'absorption à 1175 cm^{-1} tend à montrer qu'il doit s'agir d'un groupement isopropyle.

Les spectres de R. M. N. présentent un doublet à 48-54 cps, correspondant à 6 protons ; nous avons donc un groupement isopropyle dans chacun des produits étudiés et les esters sont identifiés à l'iospentadécanoate et l'isoheptadécanoate de méthyle (IX et X).



IX X

Dans la fraction d'esters insaturés (8 p. 100 des esters méthyliques de la fraction acide totale), nous avons cherché le corynomycolénate de méthyle.

Distillée dans un tube à boules, cette fraction donne 14 p. 100 d'un produit passant au-dessus de 200° (200-230°) sous 0,01 mmHg. Espérant trouver du corynomycolénate de méthyle, nous avons soumis cette fraction à la spectrométrie de masse ; l'étude du spectre a montré que nous étions en fait devant un mélange de produits. Aucun pic à m/e = 270 (pic du palmitate de méthyle) n'est observé sur ce spectre, ce qui exclut la présence de corynomycolénate de méthyle dans ce mélange.

2/ Etude de la fraction neutre : A partir de cette fraction, un mélange de glycérides a été isolé. La saponification de ces glycérides donne les mêmes acides que la fraction d'acides libres ; on trouve notamment les acides iso C_{15} (constituant majeur) et iso C_{17}.

B - Etude des extraits éthéro-alcoolique et chloroformique

Cette étude nous a permis d'isoler les mêmes acides libres et le même mélange de glycérides que dans l'extrait acétonique. La recherche d'acide corynomycolique dans ces extraits est restée négative.

Conclusion : Il est remarquable que dans *C. parvum* l'acide isopentadécanoïque constitue plus de 90 p. 100 des acides saturés. Ceci joint au fait que nous n'avons pas isolé d'acides du type corynomycolique de cette espèce, tend à la différencier des autres membres du genre des Corynébactéries, pour lesquels une étude chimique détaillée a été réalisée. On peut constater que *C. parvum* est classé parmi les espèces anaérobies des Corynébactéries (13) et qu'il a été cultivé en anaérobiose stricte, alors que les espèces étudiées précédemment ont été cultivées en aérobiose ; mais l'anaérobiose, qui n'est pas de règle chez les bactéries produisant des iso et antéiso acides, ne peut expliquer cette différenciation ; rappelons que la présence de ces acides a été signalée chez différents genres bactériens. Parmi ceux qui font partie des Eubacteria on peut citer *Bacillus subtilis* (10, 11), *Ruminococcus flavefaciens* (14), *Sarcina* (15) et *Micrococcus lysodeikticus* (16, 17). Parmi les actinomycétales, *Nocardia astéroïdes* (18) et différentes espèces de *Streptomyces* sont à signaler (19 et 20).

PARTIE EXPERIMENTALE

I - IDENTIFICATION DES ACIDES α-RAMIFIES, β-HYDROXYLES DANS LES LIPIDES DE QUELQUES ESPECES DE CORYNEBACTERIES AEROBIES

a) Identification des homologues d'acides corynomycolique et corynomycoléniques dans les lipides de *Corynebacterium* 506.

Culture des bactéries

Corynebacterium 506 a été isolé d'une lésion de tuberculose pulmonaire expérimentale de la souris, dans le service de Monsieur le Professeur M. Bariety à l'Institut Pasteur, Paris. La culture a été faite sur le milieu V.F. glucosé à 2 ‰ (21) (20 boîtes de Roux), pendant 8 jours à 38°. On centrifuge les bactéries. L'étude porte sur le culot(*).

Isolement et purification des acides mycoliques

Les bactéries, encore humides, ont été traitées par 150 ml de potasse méthanolique à 5 % : on chauffe au reflux pendant 4 heures ; on sépare alors une fraction acide ; 106 mg et une fraction "neutre" : 293 mg. La fraction neutre est chromatographiée sur 9 g de gel de silice ; on utilise 10 ml d'éluant pour chaque élution (chromatographie I).

(*) La culture de ces bactéries, ainsi que celle de *Corynébactérium 6083-9* a été effectuée par Mlle J. Sifferlen, dans le service de Monsieur le Professeur M. Bariety ; nous les en remercions très vivement.

Chromatographie I

Fractions n°	Nature de l'éluant		Quantité obtenue en mg
1 à 7	Ether de pétrole à éther de pétrole-benzène	50:50	0
8	Ether de pétrole-benzène	40:60	1
9	" " " "	30:70	4
10 à 11	" " " "	20:80	8
12	" " " "	10:90	2
13	Benzène		0
14	Benzène-éther	90:10	0
15	" "	80:20	0
16	" "	70:30	1
17	" "	60:40	95
18	" "	" "	39
19	" "	50:50	40
20	" "	" "	16
21	" "	" "	15
22	" "	40:60	10
23	" "	" "	7
24	" "	30:70	9
25	" "	20:80	8
26	" "	10:90	5
27	Ether		5
28	Ether-méthanol	90:10	4
29	" "	80:20	2
30	" "	70:30	5
31	" "	60:40	5
32	" "	50:50	1
33	" "	40:60	5
34	" "	30:70	1
35	" "	10:90	2
36	Méthanol		3
37	Ether-acide acétique	95:5	2
			Total : 295 mg

Les fractions 17 à 31 traitées par le diazométhane ont été chromatographiées sur couche mince selon Lanéelle (29). Ces fractions donnent une tache dont le Rf est voisin de celui du corynomycolate de méthyle. Par chromatographie préparative sur plaque, on isole le produit correspondant : 95 mg ; ce produit est semi-liquide $[\alpha]_D = +5,6°$; spectre I.R. bandes à 1728 et 1745 cm^{-1} ; spectre de R.M.N. triplet 312-322 cps.

Pyrolyse : 25 mg de produit ont été pyrolysés par chauffage jusqu'à 290° dans un tube à boules sous le vide d'une trompe à eau et la fraction distillée (21,4 mg) a été chromatographiée sur deux colonnes.

Colonne de polyester : (succinate de butanediol) à 15 % sur célite ; longueur de la colonne : 3 m ; diamètre intérieur : 4 mm. On commence la chromatographie à 150° avec un programme de 2,9°/mn.

Colonne de silicone : DC 550 à 5 % sur célite ; longueur de la colonne : 2,5 m ; diamètre intérieur : 4 mm. On commence la chromatographie à 160° avec un programme de 2,9°/mn.

L'appareil utilisé est un F. et M. muni d'un catharomètre. Le gaz vecteur est l'hélium (4,5 l/h). Les résultats de ces chromatographies sont rapportés dans la figure 1 (A et B).

Oxydation par le nitrate d'argent alcalin : le procédé utilisé pour cette oxydation est déjà rapporté (voir chapitre III).

La chromatographie en phase gazeuse des produits oxydés et traités avec le diazométhane, se fait sur les mêmes colonnes que précédemment (voir figure 2 C et D).

Spectrométrie de masse : elle a été effectuée sur un appareil Atlas CH_4 en utilisant le système d'introduction directe.

b) Mise en évidence des esters α-ramifiés, β-hydroxylés dans les lipides de *Corynebacterium rubrum* et *Corynebacterium* 6083-9 :

Les techniques utilisées sont les mêmes que dans le paragraphe précédent, nous n'y reviendrons donc pas. La seule différence réside dans la culture de *C. rubrum* qui a été effectuée sur le milieu Difco (Nutrient Broth) à 24° en agitant les bactéries dans un bain marie Nissman pendant 10 jours. Dans l'expérience avec le propionate $3-^{14}C$ on ajoute 30 μC du sel de sodium de cet acide à un litre de culture au 9ème jour.

II - ETUDE DES LIPIDES D'UNE ESPECE ANAEROBIE DE CORYNEBACTERIES

Isolement des acides isopentadécanoïque et isoheptadécanoïque des lipides de *Corynebacterium parvum*.

Les bactéries ont été cultivées pendant 48 heures sur bouillon VF glucosé (formule Prévot et Boorsna, 1939) en anaérobiose stricte(*), filtrées et pesées ; on obtient ainsi 1200 g de bactéries (poids humide) que l'on extrait d'abord à l'acétone, ensuite par le mélange alcool-éther et finalement au chloroforme. Les résultats sont reportés sur le tableau I.

Tableau I

Nature de l'extrait	poids en mg	p. 100 par rapport au poids humide des bactéries	p. 100 de l'éthérosoluble dans chaque extrait
Acétonique	8.600	0,72 p. 100	42 p. 100
Ethéro-alcoolique	16.700	1,4 p. 100	4,1 p. 100
Chloroformique	436	0,036 p. 100	66 p. 100

Etude de l'extrait acétonique : Cet extrait est obtenu par l'extraction des bactéries une fois avec 20 litres et ensuite deux fois avec 4 litres d'acétone. Après évaporation du solvant dans un évaporateur rotatif (température du bain 45°), on obtient 8,6 g de produit partiellement soluble dans l'éther et dans l'acétone, mais presque totalement soluble dans le méthanol. L'insolubilité dans l'éther et l'acétone s'explique par la présence d'une forte proportion

---

(*) Les cultures ont été préparées dans le service de M. le Professeur A.R. Prévot à l'Institut Pasteur de Paris ; qu'il nous soit permis de le remercier très vivement.

de produits hydrosolubles ne se solubilisant pas dans ces solvants, mais solubles dans le méthanol.

7,8 g *d'extrait acétonique*, traités par l'eau et l'éther, laissent séparer 3,2 g d'éthérosoluble. Cet éthérosoluble, dissous dans l'éther de pétrole, laisse précipiter une faible fraction rouge brun que l'on écarte par filtration. Le filtrat représente 96 % environ de l'éthérosoluble. Cette fraction est alors séparée en acide et neutre par traitement à la potasse ; on centrifuge dans des ampoules à décanter spéciales pour prévenir les émulsions gênantes. On obtient ainsi 2,23 g de fraction neutre.

Etude de la fraction acide : le titrage est effectué sur 2 à 3 mg d'acide en présence de bleu de bromothymol et en utilisant comme référence l'acide tétracosanoïque (voir chapitre III).

L'estérification se fait par le diazométhane en solution éthérée en ajoutant une goutte de méthanol au mélange réactionnel. La séparation des esters saturés et insaturés se fait de la manière suivante : dans un ballon de 500 ml on introduit 1,5 g de mélange d'esters, 8,4 g d'acétate mercurique, 250 ml de méthanol, 2,5 ml d'eau et 0,75 ml d'acide acétique ; on adapte un réfrigérant et on chauffe à 60° de façon à dissoudre l'acétate mercurique. On abandonne une nuit à l'obscurité, on évapore le solvant à la trompe à eau et on finit de sécher dans un dessicateur. On prépare alors une colonne de 125 g d'acide silicique recouvert de laine de verre et on introduit le produit trituré (à 60°) dans le benzène. On élue avec le benzène jusqu'à ce que les derniers 50 ml de benzène ne contiennent plus de produit ; environ 500 ml de benzène sont nécessaires. On obtient ainsi 1,3 g d'esters saturés.

On élue alors avec l'éthanol absolu contenant 5 % d'acide acétique. 500 ml d'alcool ont été utilisés ; on amène le volume à 100 ml par évaporation, on ajoute 20 ml d'HCl concentré et 40 ml d'eau ; on agite pendant 5 minutes, on ajoute alors assez d'eau pour qu'un trouble apparaisse. On agite encore pendant 10 min. et on extrait à l'éther ; on lave à l'eau et on sèche sur SO_4Na_2. On obtient ainsi 112 mg de fraction insaturée.

La chromatographie sur acide silicique de 1,2 g d'esters saturés donne les résultats indiqués sur le tableau (voir chromatographie II). On utilise 40 g d'acide silicique, volume d'éluant : 120 ml pour chaque élution :

Chromatographie II

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité de produit en mg
1	Ether de pétrole 95:5	0
2	Ether de pétrole-benzène 90:10	0
3	" " " " 85:15	0
4	" " " " 80:20	traces
5	" " " " " "	498
6	" " " " " "	378
7	" " " " " "	121
8	" " " " " "	96
9	" " " " " "	65
10	" " " " " "	20
11	Benzène	traces
12	Benzène-éther 50:50	5
13	Ether-ac. acétique 95:5	traces
		Total : 1.183 mg

La chromatographie en phase vapeur a été faite sur une colonne de silicone à 5 % de deux mètres de long et de 4 mm de diamètre ; le chromosorb est utilisé comme support et le gaz vecteur est l'hélium ; l'appareil (F. et M.) permet la programmation de la température. Dans l'étude analytique nous avons en général commencé la chromatographie à 150° avec un programme de température de 1,5°/min.

Pour les chromatographies préparatives, nous avons commencé à 130° avec un programme de température de 1,5°/min; des quantités de produit de l'ordre de 3 à 7 mg sont introduites à chaque injection.

L'analyse des acides isopentadécanoïque et isoheptadécanoïque provenant de la saponification des esters correspondants donne les résultats suivants :

$C_{15}H_{30}O_2$,	calc. %	C 74,38	H 12,40
	tr.	74,13	12,35
$C_{17}H_{34}O_2$,	calc. %	75,55	12,59
	tr.	75,95	12,51

Etude de la fraction neutre : 240 mg de la fraction neutre ont été chromatographiés sur acide silicique. Les résultats sont reportés sur le tableau (voir chromatographie III). On utilise 7,5 g d'acide silicique, volume d'éluant : 22,5 ml pour chaque élution.

Chromatographie III

Fraction n°	Nature de l'éluant		Quantité de produit en mg
1	Ether de pétrole		39
2	Ether de pétrole-benzène	1:1	20
3	" " " "	2:2	24,5
4	" " " "	1:2	11
5	" " " "	1:2	4
6	Benzène		13,5
7	Benzène-éther	95:5	7,7
8	" "	80:20	80
9	" "	" "	4
10	" "	50:50	2
11	Ether		4
12	Ether-méthanol	95:5	4
13	" "	90:10	3
14	" "	80:20	traces
15 et 16	Ether-ac. acétique	95:5	1,3
			Total : 218 mg

La saponification de la fraction 8 de cette chromatographie est effectuée par la potasse méthanolique à 5 % ; on chauffe au reflux pendant 4 heures. Cette saponification fournit 56 mg de fraction acide, dont le titrage effectué comme précédemment donne un poids moléculaire moyen de 245, et 4,4 mg d'une fraction neutre. Les chromatographies descendantes, sur papier, de l'hydrosoluble sont faites en utilisant du papier Wattman n° 1. On utilise soit le phénol saturé d'eau, soit le mélange butanol-acide acétique-eau (4:1:5) comme solvant d'élution. La révélation est faite à l'acide périodique-benzidine selon (23). On trouve une seule tache dont le Rf correspond à celui du glycérol.

L'estérification de la fraction acide et la chromatographie en phase vapeur sont effectuées selon les techniques déjà décrites.

Etude de l'extrait alcool-éther : l'extrait alcool-éther est obtenu en extrayant les bacilles 8 fois par 4 litres d'un mélange alcool-éther (1 : 1). On obtient ainsi 16,7 g de produit très pauvre en fraction éthérosoluble. Cet éthérosoluble obtenu de la manière habituelle, amené à sec et repris par l'éther de pétrole, laisse, comme l'extrait acétonique, précipiter une faible fraction rouge-brun que l'on écarte par filtration ; on obtient ainsi 685 mg de produit que l'on chromatographie sur acide silicique (voir chromatographie IV). On utilise 25 g d'acide silicique, volume d'éluant : 75 ml pour chaque élution.

Chromatographie IV

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité de produit en mg
1	Ether de pétrole	33,7
2	Ether de pétrole-benzène 95:5	traces
3	" " " " 50:50	7
4	" " " " 25:75	135
5	Benzène	81
6	"	106,5
7	"	43
8	"	22
9	Benzène-éther 90:10	18
10	" " 80:20	103
11	" " " "	26,5
12	" " 70:30	47
13	" " 60:40	7
14	Ether	0
15	Ether-méthanol 95:5	25
16	" " 90:10	32,5
17	Ether-ac. acétique 95:5	traces
		Total : 687,2 mg

La fraction 4, quantitativement la plus importante, est un liquide ; on la traite par la potasse pour séparer les acides éventuellement présents. La saponification de 22,6 mg de la fraction 4 par la technique déjà décrite et le traitement habituel donnent 20 mg de fraction acide. L'hydrosoluble chromatographié sur papier ne donne aucune tache révélable à l'acide périodique-benzidine. La chromatographie en phase vapeur des esters méthyliques de la fraction acide se fait comme précédemment. Le chromatogramme est identique à celui des esters méthyliques des acides gras saturés libres.

Un échantillon de la fraction 4 est chromatographié en phase vapeur sur une colonne de silicone ; on recueille à la sortie de l'appareil l'ester donnant le pic le plus important (l'ester de l'acide isopentadécanoïque). Le spectre de masse de ce composé donne un pic moléculaire à m/e = 270 ; il s'agit donc d'isopentadécanoate d'éthyle. Etant donné que nous n'avons pas isolé d'esters éthyliques de l'extrait acétonique, il doit s'agir d'artefacts formés au cours de l'extraction à l'alcool éthylique-éther.

La fraction 6 de la chromatographie IV est un solide qui donne un poids moléculaire de 276 au titrage effectué comme précédemment. Son ester méthylique distille en totalité au-dessous de 150° sous 0,01 mmHg. La chromatographie en phase vapeur montre qu'il s'agit d'esters d'acides gras déjà mentionnés.

La fraction 10 de la chromatographie IV a été traitée comme le mélange des fractions 8, 9 et 10 de la chromatographie de l'extrait chloroformique. Des résultats qualitativement identiques ont été obtenus.

Etude de l'extrait chloroformique : l'extrait chloroformique est obtenu en extrayant les bacilles trois fois par 4 litres de chloroforme. On obtient ainsi 436 mg de produit. 300 mg de cet extrait sont repris par l'eau et l'éther. On obtient 200 mg d'éthérosoluble que l'on chromatographie sur l'acide silicique (voir chromatographie V). La chromatographie est effectuée sur 6 g d'acide silicique, volume d'éluant : 18 ml pour chaque élution.

Chromatographie V

Fraction n°	Nature de l'éluant		Quantité de produit en mg
1	Ether de pétrole		27
2	Ether de pétrole-benzène	1:1	9
3	" " " "	1:2	33
4	" " " "	1:2	2
5	" " " "	1:3	1
6	Benzène		10
7	Benzène-éther	95:5	13
8	" "	90:10	48
9	" "	85:15	10
10	" "	" "	traces
11	" "	75:25	3
12	" "	50:50	2
13	Ether		6
14	Ether-méthanol	95:5	traces
15	" "	90:10	9
16	" "	80:20	6
17	" "	60:40	8
18	" "	40:60	traces
19	Ether-acide acétique	98:2	"
			Total : 187 mg

Les fractions 7, 8 et 9 de cette chromatographie ont été réunies et traitées au diazométhane. On chromatographie alors 70 mg du mélange ainsi traité sur une colonne d'acide silicique (voir chromatographie VI). La chromatographie est effectuée sur 2 g d'acide silicique, volume d'éluant : 6 ml pour chaque élution.

La fraction 4 est un liquide qui distille avant 150° sous 0,01 mmHg. Sa chromatographie en phase vapeur donne les pics des esters déjà mentionnés. Le spectre I. R. de la fraction 9, éluée avec le mélange benzène-éther 15 %, est superposable à celui du mélange des glycérides isolés de l'extrait acétonique.

Chromatographie VI

Fraction n°	Nature de l'éluant	Quantité de produit en mg
1	Ether de pétrole	0
2	Ether de pétrole-benzène 85:15	0
3	" " " " 80:20	4
4	" " " " " "	18
5	" " " " 75:25	4
6	50:50	0
7	Benzène	0
8	Benzène-éther 90:10	1
9	" " 85:15	37
10	" " " "	2
11	Ether	traces
		Total : 66 mg

BIBLIOGRAPHIE

(1) E. LEDERER, J. PUDLES, S. BARBEZAT et J.J. TRILLAT - Bull. Soc. Chim. (France), 19, 93 (1952).

(2) J. ASSELINEAU - Biochim. Biophys. Acta, 54, 359 (1961).

(3) A. DIARA et J. PUDLES - Bull. Soc. Chim. Biol. 41, 481 (1959).

(4) J. ASSELINEAU - Les lipides bactériens. Hermann, Paris (1962).

(5) E. LEDERER - VIIème Corso Estivo di Chimica, Milano, 1962, Academia Nationale del Lincei, Roma, 159-179 (1964).

(6) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Nature, 166, 782 (1950).

(7) F. ASINGER - Ber., 75., 656 (1942).

(8) R. RYHAGE et E. STENHAGEN - in F.W. McLafferty. Mass Spectrometry of Organic ions. Academic Press Inc. New York. 1963.

(9) H. GOLDFINE et K. BLOCH - J. Biol. Chem. 236, 2596 (1961).

(10) T. KANEDA - J. Biol. Chem. 238, 1222 (1963).

(11) K. SAITO - J. Biochem. (Tokyo) 47, 710 (1960).

(12) L.J. BELLAMY - The Infrared Spectra of complex Molecules, John Wiley and Sons, Inc. New York, 1964.

(13) A.R. PREVOT - Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Monographie, Institut Pasteur, Paris (1957). Masson et Cie.

(14) M.Y. ALLISON, M.P. BRYANT, I. KATZ et M. KENNEY - J. Bacteriol., 83, 1084 (1962).

(15) K. AKASHI et K. SAITO - J. Biochem. (Tokyo), 47, 222 (1960).

(16) M.G. MACFARLANE - Biochem. J. 79, 4P (1961).

(17) W.J. LENNARZ - Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 112 (1961).

(18) C. BORDET et G. MICHEL - Biochim. Biophys. Acata, 70, 613 (1963).

(19) A. BALLIO, S. BARCELLONA et L. BORNIFORTI - Biochem. J. 94 11C (1965).

(20) W. HOFHEINZ et H. GRISEBACH - Z. Naturforsch 20b,43 (1965).

(21) A.R. PREVOT - Technique pour le diagnostic des bactéries anaérobies. Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé. P. 25 (1960).

(22) G. LANEELLE - C.R. Acad. Sci. 257, 781 (1963).

(23) H.T. GORDON, W.T. THORNBURG et L.W. WERUM - Anal. Chem. 28, 849 (1956).

CHAPITRE IX

CONCLUSIONS GENERALES ET DISCUSSIONS

I - STRUCTURE DES ACIDES MYCOLIQUES

Par l'utilisation des techniques modernes d'isolement, de purification et de détermination de structure, nous avons pu mettre en évidence des acides C_{34} et C_{36}-corynomycoliques et corynomycoléniques chez les Corynébactéries, et élucider la structure des acides nocardiques de *N. astéroïdes* et de plusieurs acides α-mycoliques de Mycobactéries.

Une technique simple et rapide a été mise au point en vue de l'étude de structure et de l'analyse de mélange d'esters α-ramifiés, β-hydroxylés (voir chapitres II et VIII et réf. (1)), qui est surtout applicable dans le cas des acides de type "corynomycolique" : on pyrolyse le mélange d'esters α-ramifiés, β-hydroxylés et on fait une chromatographie en phase vapeur sur deux colonnes, une colonne apolaire et une colonne polaire ; on oxyde le mélange des produits de pyrolyse par Ag_2O alcalin et on rechromatographie, après estérification par le diazométhane, sur les mêmes colonnes. Le problème revient ainsi à l'analyse d'un mélange d'esters. La comparaison des chromatogrammes permet de déduire les structures.

La chromatographie pyrolytique directe des esters α-ramifiés, β-hydroxylés a été appliquée dans le cas de corynomycolate de méthyle, des nocardates de méthyle et des mycolates de méthyle (voir chapitre II). Le résultat le plus intéressant a été obtenu avec les nocardates de méthyle où nous avons pu, pour la première fois, mettre en évidence la diversité du fragment méronocardique de ces acides.

La spectrométrie de masse d'esters α-ramifiés, β-hydroxylés, a été d'une grande utilité dans la détermination de structure de ces composés. Nous avons montré que dans le cas des produits naturels les spectres étaient constitués de ceux des esters et des aldéhydes provenant de la pyrolyse dans le système d'introduction (chapitre II). L'utilisation d'un système d'introduction directe a permis en outre de déceler des pics d'anhydromycolates de méthyle ayant des masses moléculaires jusqu'à 1200 (voir chapitre II et réf. (2)).

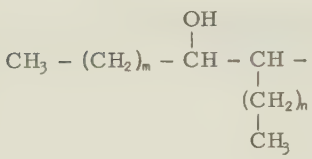
Par ailleurs, des mesures de masses effectuées ont permis de vérifier que les acides α-ramifiés, β-hydroxylés à haut poids moléculaire fournissent également le spectre des esters et des aldéhydes provenant soit de la pyrolyse, soit du réarrangement des ions moléculaires.

Trois genres bactériens ont été étudiés en vue d'élucider la structure des acides α-ramifiés, β-hydroxylés qu'ils renferment : les Corynébactéries, les Nocardia et les Mycobactéries.

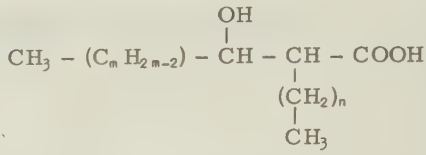
a) Les Corynébactéries : trois espèces aérobies et une espèce anaérobie de Corynébactéries ont été examinées. Les trois espèces aérobies sont :

Corynebacterium 506, *Corynebacterium 6083-9* et *Corynebacterium rubrum*, et l'espèce anaérobie est *Corynebacterium parvum* (voir chapitre VII et réf. (3 et 4)).

Corynebacterium 506 fournit des acies de structure générale I et II :



I

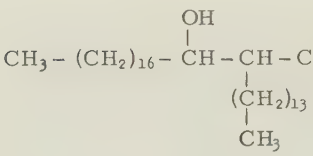


II

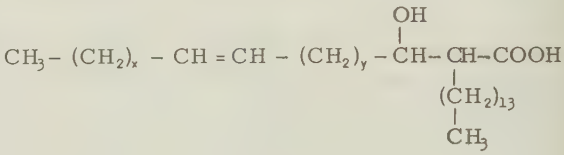
m = 14, 16

n = 11, 13, 15

Les deux constituants dominants du mélange ont les structures III et IV :



III ($C_{34}H_{68}O_3$)

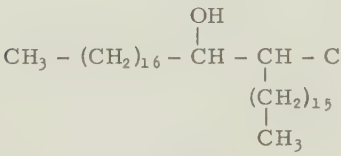


IV ($C_{34}H_{66}O_3$)

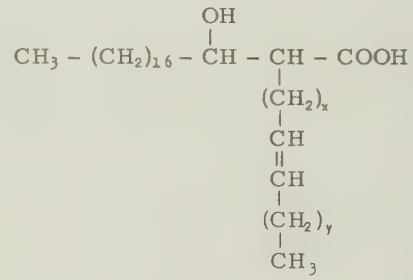
x + y = 14

Ces deux composés sont des homologues supérieurs des acides corynomycolique et corynomycolénique.

Corynebacterium 6083-9 fournit un mélange d'acides α-ramifiés, β-hydroxylés de structure générale I ou m = 13 à 17 et n = 11 à 15 ; ici les deux ramifications comportent, en faibles proportions, des termes impairs. Le représentant le plus important du mélange a la structure V ; on décèle également dans ce mélange le composé VI :



V ($C_{36}H_{72}O_3$)



VI ($C_{36}H_{70}O_3$)

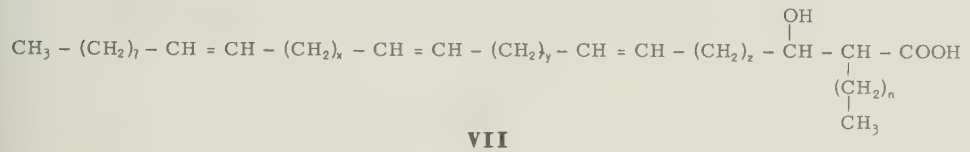
x + y = 13

Corynebacterium rubrum fournit un mélange d'acides α-ramifiés, β-hydroxylés dont les esters méthyliques donnent par pyrolyse des esters de C_{11} à

C_{16} avec des proportions appréciables de termes impairs. Les fragments méromycoliques sont formés de termes saturés, insaturés, à nombre pair et impair d'atomes de carbone de C_{17} à C_{30}.

L'espèce anaérobie de Corynébactéries étudiée est *C. parvum* : à partir de cette espèce nous n'avons pas isolé d'acide α-ramifié, β-hydroxylé ; par contre les acides isopentadécanoïque et isoheptadécanoïque ont été trouvés.

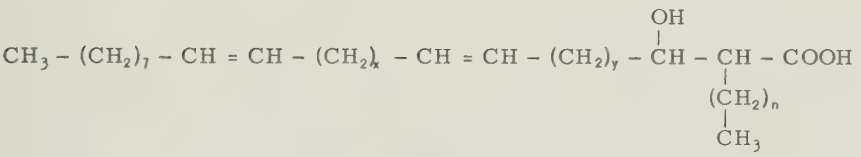
b) Les Nocardia : Dans ce genre bactérien, *Nocardia asteroïdes* a été étudié : deux groupes d'acides α-ramifiés, β-hydroxylés (VII et VIII) ont été mis en évidence (voir chapitre VII et réf. (5)). Ces acides comportent 2 ou 3 insaturations :



VII

$x + y + z = 15, 17, 19, 21$

$n = 11, 13$



VIII

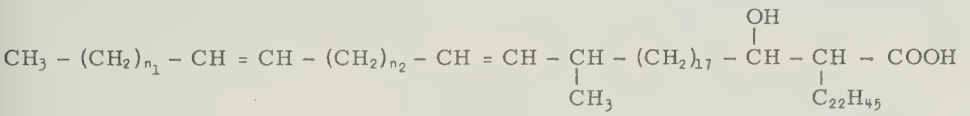
$x + y = 25, 27$ et 29

$n = 11$ et 13

Les acides nocardiques, ne diffèrent apparemment des acides corynomycoliques que par la condensation d'un nombre supplémentaire d'unités acétiques et l'apparition d'une ou deux double liaisons en plus.

c) Les Mycobactéries : Les acides α-mycoliques de trois espèces ont été particulièrement étudiés : *M. smegmatis*, *M. kansasii* et *M. tuberculosis* souche Test.

Chez *M. smegmatis* : Les mycolates de méthyle ont la structure générale IX (voir chapitre IV et réf. (6)) :

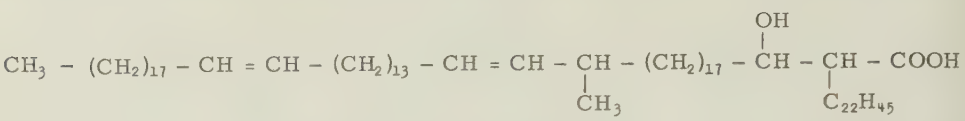


IX

$n_1 = 15$ à 19

$n_2 = 12$ à 16

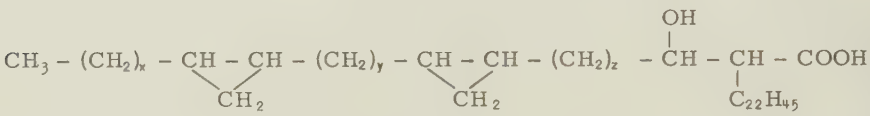
Le représentant quantitativement le plus important dans le mélange à la structure X :



X

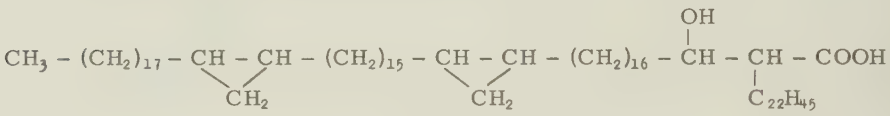
$(C_{79}H_{154}O_3)$

Dans le cas de *Mycobacterium kansasii* nous avons établi la structure générale XI pour les acides α-mycoliques (voir chapitre IV et réf. (2)) :



XI

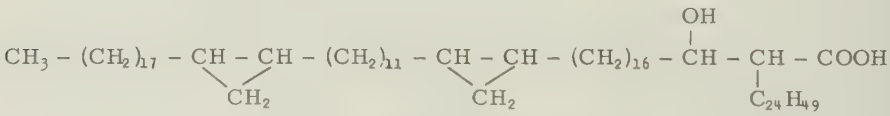
Le représentant dominant dans le mélange à la structure XII :



XII

Les acides α-mycoliques de *M. tuberculosis* souche Test ont une structure voisine de celle des acides α-kansamycoliques. La structure générale XI est valable pour ces acides, à la différence près que la ramification en α comporte deux carbones de plus (voir chapitre V).

Nous avons proposé la structure XIII pour le représentant le plus abondant du mélange d'acides α-mycoliques Test :



XIII

Remarquons qu'avec les acides mycoliques de Mycobactéries, c'est la première fois que nous sommes en présence de produits naturels comportant des chaînes hydrocarbonées linéaires à 80 atomes de carbones et plus.

II - BIOGENESE DES ACIDES MYCOLIQUES

Nous avons étudié la biogénèse des acides nocardiques de *Nocardia asteroïdes* et proposé la voie biogénétique suivante (voir chapitre VII et réf. (7)) :

$$CH_3 - (CH_2)_7 - CH_2 - CH_2 - (CH_2)_5 - \overset{*}{C}OOH + n\ (CH_3\ COOH) \longrightarrow$$

$$CH_3 - (CH_2)_7 - CH = CH - \overset{*}{\overbrace{(CH_2)_x - CH}} = CH - (CH_2)_y - COOH + \underset{\underset{C_{14}H_{29}}{|}}{CH_2} - \overset{*}{C}OOH \longrightarrow$$

$$CH_3 - (CH_2)_7 - CH = CH - \overset{*}{\overbrace{(CH_2)_x - CH}} = CH - (CH_2)_y - \underset{\underset{C_{14}H_{29}}{|}}{\overset{\overset{OH}{|}}{CH} - CH} - \overset{*}{C}OOH$$

Selon ce schéma une unité d'acide palmitique servirait d'initiateur et par condensation avec des unités acétiques et désaturation aboutirait à l'acide méronocardique ; ce dernier se condenserait alors avec une 2ème molécule d'acide palmitique pour former un acide nocardique.

Dans le cas des acides α-mycoliques de *Mycobacterium smegmatis* nous avons proposé la voie de biogénèse suivante (voir chapitre VI et réf. (8)).

$$CH_3 - (CH_2)_{n_1} - CH = CH - (CH_2)_{n_2} - CH = CH - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_{17} - COOH + \underset{\underset{C_{22}H_{45}}{|}}{CH_2} - \overset{*}{C}OOH \longrightarrow$$

$$CH_3 - (CH_2)_{n_1} - CH = CH - (CH_2)_{n_2} - CH = CH - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_{17} - \underset{\underset{C_{22}H_{45}}{|}}{\overset{\overset{OH}{|}}{CH} - CH} - \overset{*}{C}OOH$$

Nous avons en effet montré que les carbones 1 et 2 et la ramification en α trouvent leur origine biogénétique dans l'acide tétracosanoïque ; le carbone du groupement méthyle provient de la méthionine. Nous avons montré aussi que la longue chaîne hydrocarbonée du fragment méromycolique ne provient pas, essentiellement, d'un simple allongement de chaîne à partir de l'acide tétracosanoïque.

Etant donné que nous avons établi la possibilité de l'utilisation de l'acide palmitique, comme initiateur, dans la génèse des acides méronocardiques, nous nous sommes demandés si ce même acide ne servirait pas de "relais" sur la voie de la biogénèse des acides méromycoliques. Un résultat encourageant, dans ce sens, a été obtenu : en introduisant de l'acide palmitique marqué dans le milieu de culture de *M. smegmatis* nous avons isolé, par les traitements habituels, les mycolates de méthyle. Après pyrolyse le tétracosanoate de méthyle montre 800 c/min/mg alors que les méroaldéhydes présentent 1350 c/min/mg. Ce résultat semble indiquer que l'acide palmitique a servi d'initiateur dans la génèse du fragment méromycolique.

La comparaison de la structure des acides mycoliques de *M. smegmatis* et de *M. kansasii* nous a conduits à suggérer l'existence d'un précurseur hypothétique représenté par XIV pour les acides méromycoliques correspondants :

$$CH_3 - (CH_2)_{17} - CH = CH - (CH_2)_{13} - CH_2 - CH_2 - CH = CH - (CH_2)_{16} - COOH$$

XIV

Ce précurseur, méthylé sur la carbone 19 et désaturé sur les carbones 20 et 21, aboutirait à l'acide α-smegma-méromycolique, mais su-

bissant une double "méthylénation" avec formation de deux cycles propaniques donnerait naissance à l'acide α-kansa-méromycolique.

Nous verrons plus loin une 2ème voie possible pour la génèse des acides méromycoliques, voie qui ferait intervenir un deuxième "relais".

III - INTERET TAXONOMIQUE DES ACIDES MYCOLIQUES

Asselineau et Lederer se sont déjà interrogés sur l'intérêt taxonomique des acides mycoliques (9, 10). Le tableau I, page 6 indique le rapport entre le nombre d'atomes de carbone des acides mycoliques et la taxonomie : il ressort de ce tableau que les acides à 32 atomes de carbone environ sont caractéristiques des Corynébactéries, ceux à 50 atomes de carbone environ se trouvent chez les Nocardia et des acides à 88 atomes de carbone environ chez les Mycobactéries. Les résultats de nos expériences dans ce doamine peuvent se résumer dans le tableau suivant :

	Nombre d'atomes de carbone des acides mycoliques	Nombre d'atomes de carbone des fragments méromycoliques	Nombre d'atomes de carbone des acides de pyrolyse
I - Corynébactéries :			
Corynebacterium 506	C_{32}, $\underline{C_{34}}$*	C_{16}, $\underline{C_{18}}$	C_{14}, $\underline{C_{16}}$ et C_{18}
Corynebacterium 6083-9	C_{34}, C_{35} $\underline{C_{36}}$	C_{15} à $\underline{C_{18}}$	C_{14} à $\underline{C_{18}}$
C. rubrum	29 à 46	C_{17} à C_{30}	C_{12} à C_{16}
II - Nocardia :			
N. astéroïdes	C_{46} à C_{54}	C_{32}, C_{34}, C_{36} et C_{38}	C_{14} et $\underline{C_{16}}$
III - Mycobactéries :			
M. smegmatis	74 à $\underline{79}$ ... 81	50 ... $\underline{55}$ ... 57	C_{24}
M. kansasii	78, $\underline{80}$ et 82	54, $\underline{56}$ et 58	C_{24}
M. tuberculosis (souche Test)	$\underline{78}$, 80, 82, 84	$\underline{52}$, 54, 56, 58	C_{26}

On voit que, sauf dans le cas de *C. rubrum*, le nombre d'atomes de carbone des acides mycoliques des Corynébactéries peut s'expliquer par la condensation de deux unités d'acides gras banaux, le plus généralement en C_{16} ou en C_{18} ou d'une unité en C_{16} et d'une unité en C_{18}.

Pour le cas de *N. asteroïdes* des unités d'acides gras avec en moyenne 32 à 38 atomes de carbone se sont condensées avec les acides en C_{14} ou C_{16} et le nombre d'atomes de carbone des nocardates est de 46 à 54.

(*) Les chiffres soulignés indiquent les représentants dominants dans le mélange.

Avec les Mycobactéries la condensation mycolique a lieu sur un acide méromycolique ayant en moyenne environ 50 à 58 atomes de carbone ce qui aboutit aux acides mycoliques avec environ 74 à 84 atomes de carbone. Il reste donc en général vrai que le nombre d'atomes de carbone des acides mycoliques est en rapport avec la taxonomie.

IV - SIGNIFICATION PHYLOGENETIQUE DES ACIDES MYCOLIQUES

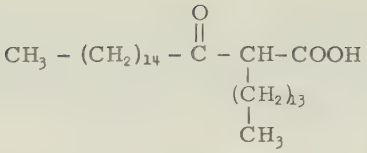
Il est curieux de constater cette régularité du nombre d'atomes de carbone des acides mycoliques : très schématiquement on peut dire que si les acides corynomycoliques présentent en moyenne 34 atomes de carbone, les acides méronocardiques présentent également le même nombre d'atomes de carbone environ et que si les acides nocardiques possèdent environ 50 atomes de carbone, un acide méromycolique possède également environ 50 atomes de carbone.

Nous avons vu (chapitre III) que dans le cas de *M. smegmatis* à côté des acides α-smegmamycoliques, il existe un deuxième groupe d'acides mycoliques appelé acides α'-mycoliques. L'étude de structure complète de ces acides n'a pas encore été faite mais nous savons, d'après l'analyse de leurs esters méthyliques, des acétates de ces esters et des méroaldéhydes, qu'il s'agit d'un mélange d'acides à environ 60 atomes de carbone ; or ces acides sont α-ramifiés, β-hydroxylés, leurs esters méthyliques donnent à la pyrolyse du tétracosanoate de méthyle ; ces acides, qui par le nombre d'atomes de carbone entrent en réalité dans la catégorie des acides nocardiques(*) et sembleraient tout désignés pour donner naissance aux acides mycoliques, ne servent pas de précurseur à ces derniers. Les mêmes bactéries fabriquent donc deux types d'acides (acides α'-smegmamycoliques et α-smegma-méromycoliques) avec le même nombre d'atomes de carbone environ, l'un α-ramifié, β-hydroxylé résultant d'une condensation mycolique, l'autre linéaire (abstraction faite du groupement méthyle), provenant, en définitive, de condensations acétique-maloniques successives. Ce fait pourrait à première vue étonner l'observateur, mais que signifie au juste la présence simultanée de ces deux types d'acides chez une Mycobactérie ? Citons d'abord d'autres faits d'expérience :

a) Il semble que des acides mycoliques en C_{60}, donc en fait des acides de type nocardique, existent chez d'autres Mycobactéries ; les acides en C_{60} signalés par Asselineau dans deux souches humaines de *M. tuberculosis* (souches Brevannes et H_{37}R v S r) (11, 12) sont probablement des acides de ce type.

b) Chez les Nocardia, si la présence des acides de type corynomycolique n'a pas été rapportée, on sait que la palmitone a été trouvée (13) chez *Nocardia brasiliensis*, et récemment Bordet et Coll. d'une part (14) et Lanéelle et Coll d'autre part (15) ont découvert la présence de hentriacontanol-16 dans les lipides de *N. brasiliensis*. Cela veut dire que l'intermédiaire immédiat de la biogénèse de l'acide corynomycolique, à savoir le cétoacide XV, a été synthétisé par ces bactéries ; sa décarboxylation donne la palmitone et la réduction de celle-ci conduit à l'hentriacontanol-16.

(*) Par leur acide de pyrolyse qui est l'acide tétracosanoïque, ces acides portent l'empreinte de leur origine mycobactérienne. Une légère discordance entre le nombre total d'atomes de carbone de ces acides et les acides nocardiques en découle.



XV

c) La présence dans les lipides de *C. diphtheriae* d'un acide appelé acide diphtérocorynique,avec la formule brute $C_{53}H_{104}O_3$, a été signalée par Gubarev et Pustalova (16). La formule brute de cet acide tend à l'affilier aux acides nocardiques.

Tous ces faits semblent donc, apparemment, en contradiction avec la portée taxonomique des acides mycoliques.

Mais il semble que la présence des acides α-ramifiés, β-hydroxylés chez les Corynébactéries, les Nocardia et les Mycobactéries soit le reflet de leur parenté génétique. L'existence des acides de type nocardique chez les Mycobactéries et certaines Corynébactéries indiquerait que la génèse de ces acides forme l'étape intermédiaire, le trait d'union, entre celle des acides corynomycoliques et les acides mycoliques.

L'aptitude à la condensation mycolique apparaîtrait au cours de l'évolution des microorganismes chez une "cellule-mère" de laquelle dériveraient les premières Corynébactéries, et puis, successivement, les Nocardia et les Mycobactéries. Ainsi peut-on expliquer la possibilité pour certaines Mycobactéries de synthétiser des acides de type nocardique de façon apparemment indépendante des acides mycoliques. Cette proposition explique également la présence des acides de type nocardique chez certaines Corynébactéries. Ces dernières, sans acquérir les caractéristiques morphologiques et certaines propriétés biologiques d'usage dans le diagnostic courant des Nocardia, auraient déjà la possibilité de synthétiser les acides nocardiques.

Vu sous cet angle on peut se faire une nouvelle idée sur les étapes de la biogénèse des acides mycoliques.

Chez les Corynébactéries deux unités d'acides gras, le plus souvent les acides palmitique et stéarique, se condensent pour former les acides "corynomycoliques".

Chez les Nocardia, l'acide palmitique (ou stéarique ou oléïque ?) subit un allongement de chaîne pour aboutir à un acide à environ C_{32} à C_{38} atomes de carbones qui subit alors la condensation mycolique.

Chez les Mycobactéries, dans une première étape, l'acide palmitique (ou stéarique) subirait la condensation avec des unités acétiques pour arriver à un acide de type méronocardique. Un tel acide pourrait subir une condensation mycolique pour donner naissance à "l'acide mycolique en C_{60}" de certaines Mycobactéries, ou alors, le plus généralement, servir de deuxième "relais" pour de nouvelles condensations d'unités acétiques. Les longues chaînes hydrocarbonées des acides méromycoliques prendraient alors naissance. Le schéma suivant résume ces propositions :

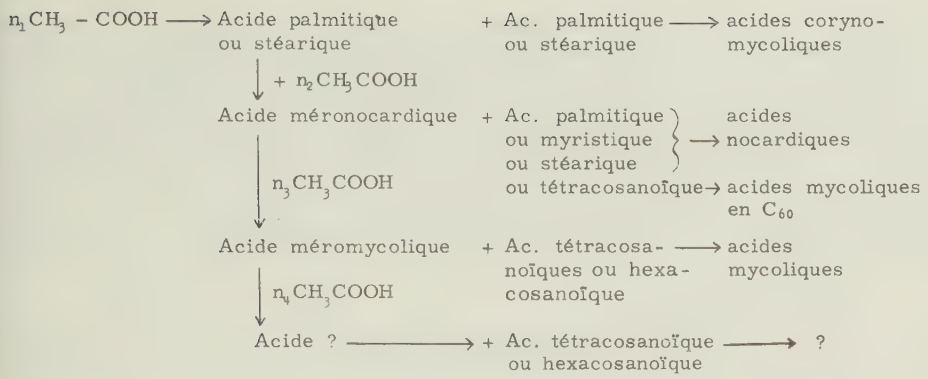


Schéma simplifié de la biogénèse des acides mycoliques en général. Les points d'interrogation indiquent l'emplacement des acides hypothétiques. Il n'est pas impossible qu'on puisse les trouver un jour. Dans ce schéma nous faisons abstraction des groupements méthyle et des cycles propaniques.

Une telle corrélation biogénétique entre les acides mycoliques des Corynébactéries, Nocardia et Mycobactéries nécessitant l'existence d'équipements enzymatiques de plus en plus perfectionnés, semble en faveur du schéma que nous proposons pour l'évolution de ces bactéries. Il va de soi qu'il s'agit là de spéculations ; seule l'expérience pourra dire si elles sont conformes à la réalité.

Rappelons que d'après la classification du traité de Bergey (17) la famille des Actinomycétaceae ne comprend pas les Corynébactéries qui sont rangées parmi les Eubactériales.

Dans le traité de Prévot (18), déjà, ce genre bactérien fait partie de la la famille des Actinomycétaceae, classée parmi les Actinomycétales. Des publications de plus en plus nombreuses apparaissent qui tendent à rechercher des corrélations entre les Actinomycétales ou d'en classer les divers représentants dans tel ou tel genre.

Cummins et Harris par l'étude de la structure chimique et les propriétés antigéniques des parois cellulaires des Corynébactéries, des Nocardia et des Mycobactéries (19, 20), sont les premiers à être arrivés à la conclusion que ces trois genres bactériens doivent avoir une corrélation taxonomique.

Kwapinski (21), par l'étude des relations sérologiques des antigènes cytoplasmiques, propose un schéma de "l'évolution antigénique et probablement biologique" des Actinomycétales. Selon cet auteur une position centrale serait occupée par *M. smegmatis*.

D'autres techniques ont été utilisées pour montrer l'existence d'une corrélation, particulièrement entre les Mycobactéries et d'autres Actinomycétales. Manion et Coll.(22) ont utilisé le test de la sensibilité aux bactériophages. Cette étude a notamment permis de rapprocher une souche de *M. rhodochrous* des Nocardia. Castelnuovo et Coll.(23), en utilisant des tests antigéniques, sérologiques et la sensibilité aux phages, sont arrivés également

à la conclusion que certaines souches de *M. rhodochrous* et de *M. pellegrino* devraient se classer parmi les Nocardia. Ces intéressants travaux ont eu pour objet principal de rechercher les similitudes, les différences et les corrélations parmi les différentes bactéries appartenant à tel ou tel genre d'Actinomycétales. Notre travail tend à souligner l'état évolutif des genres étudiés, ce qui permettrait d'expliquer certaines difficultés de classification pour des bactéries qui, ne se souciant pas de notre légitime désir de schématisation, se trouveraient à un stade quelconque d'évolution et qui auront subi des modifications plus ou moins profondes selon leur histoire et leur vie.

BIBLIOGRAPHIE

(1) A.H. ETEMADI - Bull. Soc. Chim. (France) 1537 (1964).

(2) A.H. ETEMADI, A.M. MIQUEL, E. LEDERER et M. BARBER - Bull. Soc. Chim. (France) 3274 (1964).

(3) A.H. ETEMADI - Bull. Soc. Chim. Biol. 45, 1423 (1963).

(4) A.H. ETEMADI, J. GASCHE et J. SIFFERLEN - Bull. Soc. Chim. Biol. Sous presse.

(5) C. BORDET, A.H. ETEMADI, G. MICHEL et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim.(France) 234 (1965).

(6) A.H. ETEMADI, R. OKUDA et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. (France) 868 (1964).

(7) A.H. ETEMADI et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 107 (1965).

(8) A.H. ETEMADI et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta 98, 160 (1965).

(9) J. ASSELINEAU - Les lipides bactériens. Hermann, Paris (1962).

(10) E. LEDERER - VIIème Corso di Chimica, Milano 1962, Accademia Nazionale del Lincei Roma, 159-179 (1964).

(11) J. ASSELINEAU - Bull. Soc. Chim. (France) 108 (1954).

(12) J. ASSELINEAU et J. MORON - Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 899 (1958).

(13) C. BORDET et G. MICHEL - Communication personnelle.

(14) C. BORDET et G. MICHEL - Bull. Soc. Chim. Biol., 46. 1101 (1964).

(15) M.A. LANEELLE, J. ASSELINEAU et G. CASTELNUOVO - Ann. Inst. Pasteur, 108, 69 (1965).

(16) E.M. GUBAREV et L.M. PUSTALOVA - Biokhimiya 30, 569 (1958).

(17) R.S. BREED, E.D.G. MURRAY, N.R. SMITH - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Co, Baltimore (1957).

(18) A.R. PREVOT - Traité de systématique bactérienne. Dunod, Paris, 1961.

(19) C.S. CUMMINS et H. HARRIS - J. Gen. Micorbiol, 18, 173 (1958).

(20) C.S. CUMMINS - J. Gen. Microbiol., 28, 35 (1962).

(21) J.B. KWAPINSKI - J. Bacteriol, 87, 1234 (1964).

(22) R.E. MANION, S.G. BRADLEY, H.H. ZINNEMAN et W.H. Hall - J. Bacteriol, 87, 1056 (1964).

(23) G. CASTELNUOVO, G. BELLEZZA, M.E. DUNCAN et J. ASSELINEAU - Ann. Inst. Pasteur, 107, 828 (1964).

APPENDICE

ESSAI D'UNE CLASSIFICATION POUR LES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES

Au terme de ce travail où nous avons rapporté essentiellement des données concernant un type particulier d'acides mycoliques (acides α-mycoliques), il nous paraît utile d'indiquer que nous avons été amenés à identifier et cataloguer différentes catégories de ces acides auxquelles il faudra donner des appellations claires et univoques. Ceci est d'autant plus nécessaire que nous avons, chemin faisant, introduit des termes comme pré-α et α' qui sont nouveaux dans la terminologie de la chimie des acides mycoliques. L'utilisation de ces termes nous a été imposée au début par le souci de conserver l'ossature de la nomenclature en vigueur. Les termes pré-α et α' que nous avons utilisés pour la première fois à propos du mélange d'acides mycoliques de *M. smegmatis*, étaient destinés à préserver les préfixes α et β aux deux autres types d'acides mycoliques que nous avons isolés et qui doivent correspondre aux acides α et β identifiés précédemment par Barbier et Lederer (1) ; mais bientôt nous nous sommes aperçus d'un autre genre de difficulté ; les acides α-mycoliques isolés par Asselineau et Lederer et *M. tuberculosis* (Test) (2) sont méthoxylés. Les acides α-mycoliques que nous décrivons dans le chapitre V ne sont pas les mêmes. Nous avons également identifié des acides méthoxylés dans le mélange d'acides mycoliques de *M. tuberculosis* (Test) : ces acides devraient s'appeler acides γ-mycoliques.

On voit que les termes α, β, etc. qui au départ étaient destinés à désigner les acides mycoliques par leur ordre d'élution d'une colonne de chromatographie ne peuvent plus être maintenus, à cause surtout de la grande confusion qu'ils peuvent entraîner. Une nomenclature claire et univoque doit à notre sens utiliser des termes qui consacrent, à la limite, des entités chimiques parfaitement définies. Or, nous avons vu, au cours de cette étude, que les acides mycoliques sont toujours constitués de mélanges de composés, ce qu'on peut donc faire c'est de les désigner par le type de structure qu'ils représentent. Aux différents stades de ce travail, nous avons été amenés à reconnaître 6 types d'acides mycoliques - et il en existe d'autres - on peut les désigner par les lettres majuscules A à F : dans le tableau I nous avons résumé ce que nous entendons par ces signes distinctifs A, B etc. : A un type donné d'acides mycoliques correspond d'abord le nombre moyen approximatif d'atomes de carbone et d'autre part la nature de fonctions que ces acides comportent.

Ainsi, les acides mycoliques des Mycobactéries que nous avons décrits dans cette thèse possèdent environ 80 atomes de carbone et comportent, outre le carboxyle, un seul hydroxyle en β. Tout acide de ce genre sera appelé acide mycolique de type B. De même, tout acide mycolique à environ 80 atomes (•) de carbone, en O_4, comportant outre le carboxyle et l'hydroxyle en β une

---

(•) Ces acides, en général monoinsaturés, présentent parfois quelques CH_2 de plus que les acides α-mycoliques correspondants.

Tableau 1

Désignation de différents types d'acides mycoliques de Mycobactéries

Nom déjà utilisé dans ce travail	Nature des fonctions outre le carboxyle	Nombre d'atomes de carbone	isolé de				type d'acides mycoliques
			M. smegmatis	M. kansasii	M. tuberculosis	M. avium	
Acides pré-α-mycoliques	1 - OH	?	+	+	+	+	A
α-mycoliques	1 - OH	~ 80	+	+	+	+	B
α'-mycoliques	1 - OH	~ 60	+	-	-	-	C
α'-mycoliques	1 - OH, 1 - OCH_3	~ 80	-	+	+	-	D
β-mycoliques	1 - OH, 1 $\diagdown C \diagup$ = O	~ 80	+	+	+	+	E
Acides mycoliques dicarboxyliques	1 - OH, 1 - C^{O}_{OH}	~ 60 ?	-	-	-	+	F

fonction cétone, sera appelé acide mycolique de type E. Ce sera le cas des acides β mycoliques que nous avons mentionnés dans cette thèse. Et ainsi de suite pour les autres types d'acides mycoliques.

L'adoption de cette classification permettra, non seulement la compréhension des textes futurs, mais incitera aussi les chercheurs à analyser davantage le mélange d'acides mycoliques et à en proposer d'autres types.

De nombreuses expériences avec 4 espèces de Mycobactéries nous permettent de proposer l'ordre d'élution suivant pour les esters méthyliques de différents types d'acides mycoliques mentionnés dans le tableau I. Dans les conditions rapportées dans cette thèse les mycolates de méthyle de type A sont élués d'abord, puis les mycolates de type B, C et D, E et ensuite F.

Notons que des indices seront nécessaires pour distinguer différentes catégories d'acides mycoliques dans chaque type d'acides, ainsi les acides smegmamycoliques de type B se distinguent des acides de même type isolée de *M. kansasii* et de *M. tuberculosis* (Test). Les premiers (comportant deux doubles liaisons et une ramification méthyle) nous les désignerons par B_1 et les seconds (comportant deux cycles propaniques) par B_2. A titre d'exemple nous dirons que *Mycobacterium 6083-9* ainsi que *M. avium* contiennent des acides mycoliques de type B. Dans le premier cas il semble s'agir d'acides mycoliques de type B_1 et dans le deuxième cas d'acides de type B_2 (3).

BIBLIOGRAPHIE

(1) M. BARBIER et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 14, 246 (1954).

(2) J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 7, 126 (1951).

(3) A.H. ETEMADI et E. WALCZAK - résultats inédits.

TABLE DES MATIERES

		Pages
Introduction		5
Chapitre I	: Techniques d'isolement et d'étude de structure des acides mycoliques	13
Chapitre II	: Techniques microanalytiques d'étude de structure d'esters α-ramifiés, β-hydroxylés. Chromatographie en phase vapeur et spectrométrie de masse	21
Chapitre III	: Sur la structure des acides α-smegmamycoliques	35
Chapitre IV	: Sur la structure des acides α-mycoliques de *Mycobacterium kansasii*	59
Chapitre V	: Sur la structure des acides α-mycoliques de la souche humaine Test de *Mycobacterium tuberculosis*	69
Chapitre VI	: Sur la biogénèse des acides α-smegmamycoliques	79
Chapitre VII	: Sur la structure et la biogénèse des acides nocardiques de *Nocardia asteroïdes*	89
Chapitre VIII	: Recherche des acides α-ramifiés, β-hydroxylés dans quelques espèces de Corynébactéries	99
Chapitre IX	: Conclusions générales et discussion	117
Appendice	: Essai d'une classification des acides mycoliques	129

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"SUR LA BIOGÉNÈSE DE L'EICOSANOL-2 ET OCTADENOL -2 ISOLES DES MYCOBACTERIES" (THESE ORIGINALE)

Vu et approuvé :
Paris, le 20 Mai 1965
Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

Vu et permis d'imprimer
Paris, le
Le Recteur de l'Académie de Paris

ERRATA

Page 5, ligne 2, lire "aliphatique", au lieu de "alyphatique".

Page 33, ligne 6, lire : "Les figures 5 et 6", au lieu de "Les figures 3 et 4".

Page 38, ligne 16, lire : "page 52", au lieu de "page 59".

Page 44, ligne 32, lire : "α-smegma-méromycoliques (VIa)", au lieu de α-smegma-méromycoliques (IVa)".

Page 71, ligne 12, lire : "structures IIIa", au lieu de "structures IIa".

Page 92, ligne 5, lire : "activité totale $5,7\text{-}10^6$ c/min", au lieu de "activité totale $5,17\text{-}10^6$ c/min".

Page 93, ligne 5, lire : "d'acides nocardiques", au lieu de "d'acide nocardique".

Page 111, Tableau III, fraction n° 3, lire : "1:2", au lieu de "2:2".

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN
Ouvrages scientifiques
TYPO-OFFSET
GAP (Hautes-Alpes)
Dépôt légal n° 295
1965